

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**UNIDAD DE POSGRADO**

**Actividad antioxidante y citotóxica de las fisalinas y de  
los flavonoides presentes en las hojas de *Physalis*  
peruviana L.**

**TESIS**

**Para optar al Grado Académico de magíster en Recursos Vegetales y  
Terapéuticos**

**AUTOR**

**María Martha Hernández Peves**

**Lima – Perú**

**2015**



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR  
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN RECURSOS VEGETALES Y  
TERAPEÚTICOS**

Siendo las 15:00 hrs. del 09 de diciembre 2015 se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por el Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo e integrado por los siguientes miembros: Dra. Arilmi Rosa Gorriti Gutiérrez, Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera, Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa y el Mg. César Máximo Fuertes Ruitón; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA DE LAS FISALINAS Y DE LOS FLAVONOIDES PRESENTES EN LAS HOJAS DE *Physalis peruviana* L."** presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **MARÍA MARTHA HERNÁNDEZ PEVES**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la votación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

..... *A - excelente (19) diecinueve* .....

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica **MARÍA MARTHA HERNÁNDEZ PEVES**, el Grado Académico de **Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos**.

Siendo las *16:00* hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las *16:05* hrs. del 09 de diciembre 2015.

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (P.P.,T.C.)  
Presidente

Dra. Arilmi Rosa Gorriti Gutiérrez (P.P.,T.C.)  
Miembro

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (P.P.,T.C.)  
Miembro

Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa (P.Aux.T.C.)  
Miembro

Mg. César Máximo Fuertes Ruitón (P. P., D.E.)  
Miembro - Asesor

**Observaciones:**

## DEDICATORIA

*A Dios*

*A la memoria de mi padre*

*A mi esposo por su amor y  
entrega*

*A mis hijos, mi fuente de motivación e  
inspiración*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi vida, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía.

A mi familia, por ser mi alegría, el motivo y la fortaleza para seguir adelante.

A mi asesor, el Dr. César Fuertes por la confianza y la orientación brindada, su experiencia y apoyo siempre estuvieron presente en el camino de mi carrera universitaria.

Al licenciado Fernando Retuerto por su valioso tiempo y el apoyo brindado en la parte experimental.

Al doctor Abraham Vaisberg por su preciada colaboración y las facilidades del laboratorio que dirige.

A los miembros del Jurado Examinador y Calificador de tesis por su invaluable aporte académico y consejos.

A quienes brindaron su valioso aporte y estuvieron vinculados de alguna manera a este trabajo. Mi mayor reconocimiento y gratitud.

## ÍNDICE GENERAL

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

**INDICE GENERAL**

**LISTA DE CUADROS**

**LISTA DE FIGURAS**

**RESUMEN**

**SUMMARY**

<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 PROBLEMÁTICA.....	1
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	2
1.3 JUSTIFICACIÓN TEÓRICA.....	2
1.4 JUSTIFICACIÓN PRÁCTICA .....	3
1.5 OBJETIVOS.....	3
1.5.1 Objetivo general.....	3
1.5.2 Objetivos específicos .....	3
<b>CAPITULO II: MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
2.1 ANTECEDENTES .....	4
2.2 BASES TEÓRICAS.....	6
<b>CAPITULO III: METODOLOGÍA .....</b>	<b>21</b>
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	21
3.2 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS.....	21
3.3 MARCHA FITOQUÍMICA DE LAS HOJAS .....	23
3.4 EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS FISALINAS .....	23
3.5 EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS FLAVONOIDES .....	27
3.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL ENSAYO DE DPPH .....	27
3.7 ACTIVIDAD CITOTÓXICA POR BIOENSAYO EN ERIZOS DE MAR .....	29
3.8 ACTIVIDAD CITOTÓXICA EN CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES.....	31
3.9 ANALISIS ESTADISTICO DE DATOS .....	34

<b>CAPITULO IV: RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>CAPITULO V: DISCUSIÓN .....</b>	<b>53</b>
<b>VI CONCLUSIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>67</b>

## **Relación de cuadros**

**Cuadro 1.** Nombres comunes de *Physalis peruviana* L.

**Cuadro 2.** Actividades biológicas reportadas para los extractos de cada órgano de *Physalis peruviana* L.

**Cuadro 3.** Condiciones cromatográficas para análisis de fisalinas por HPLC

**Cuadro 4.** Número y concentración de células por pozo

**Cuadro 5.** Diluciones de las fracciones de fisalinas y flavonoides utilizadas para el ensayo de citotoxicidad en líneas celulares

**Cuadro 6.** Resultados de la marcha fitoquímica de las hojas de *Physalis peruviana* L.

**Cuadro 7.** Relación entre el color de la mancha a la luz UV y la estructura del flavonoide

**Cuadro 8.** Resultados de la reacción de Shinoda para flavonoides

**Cuadro 9.** Actividad atrapadora del radical DPPH de la Vitamina C

**Cuadro 10.** Actividad atrapadora del radical DPPH de los flavonoides

**Cuadro 11.** Actividad atrapadora del radical DPPH de las fisalinas

**Cuadro 12.** Actividad citotóxica de las fisalinas de las hojas de *Physalis peruviana* L.

**Cuadro 13.** Actividad citotóxica de los flavonoides de las hojas de *Physalis peruviana* L.

## **Relación de figuras**

**Figura 1.** Biosíntesis de algunos metabolitos secundarios en las especies del género *Physalis*

**Figura 2.** *Physalis peruviana* L.

**Figura 3.** Estructura básica de los flavonoides

**Figura 4.** Esqueleto básico de witaesteroides

**Figura 5.** Estructura básica de las fisalinas

**Figura 6.** Posibles rutas biogénicas para la formación de fisalinas

**Figura 7.** Diagrama de flujo para la extracción de fisalinas en hojas de *Physalis peruviana* L.

**Figura 8.** Cromatograma en capa fina de fisalinas (a)

**Figura 9.** Cromatograma en capa fina de fisalinas (b)

**Figura 10.** Cromatograma de fisalinas A y D por HPLC

**Figura 11.** Relación % de actividad atrapadora y concentración de la vitamina C

**Figura 12.** Relación % de actividad atrapadora y concentración de los flavonoides

**Figura 13.** Actividad atrapadora del radical DPPH de las fisalinas de las hojas de *Physalis peruviana* L.

**Figura 14.** Óvulos de erizos de mar *Tetrapygus niger*

**Figura 15.** Fecundación de gametos de erizos de mar *Tetrapygus niger*

**Figura 16.** Formación de la membrana de fertilización

**Figura 17.** Fase gástrula de embriones de erizos de mar *Tetrapygus niger*

**Figura 18.** Valores de CI50 de las fracciones de fisalinas y flavonoides frente a las líneas celulares.

**Figura 19.** Índices de selectividad de las fracciones de fisalinas y flavonoides.



## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar la actividad antioxidante y citotóxica de fisalinas y flavonoides presentes en las hojas de *Physalis peruviana* L. **Diseño:** Experimental. **Lugar:** Laboratorio del Instituto de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica y Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Laboratorio de Investigación y Desarrollo “Abraham Vaisberg Wolach” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. **Materiales:** Fisalinas y flavonoides de las hojas de *Physalis peruviana* L; embriones de *Tetrapygus niger*; líneas celulares tumorales humanas H-460, HuTu80, DU145, MCF-7, M-14, HT-29, K562 y fibroblastos normales de ratón 3T3. **Intervenciones:** La evaluación de la actividad antioxidante se realizó utilizando el método del radical DPPH; la actividad citotóxica se realizó mediante el bioensayo en erizos de mar y líneas celulares tumorales. **Principales medidas de resultados:** Actividad antioxidante y actividad citotóxica. **Resultados:** El porcentaje de inhibición del radical DPPH fue de 95,0% y 26,6% para los flavonoides y las fisalinas, respectivamente; las fisalinas y los flavonoides demostraron actividad citotóxica a partir de la concentración de 10 ppm en el bioensayo con erizos de mar; se halló el porcentaje de crecimiento celular para cada dilución en cada línea celular, la concentración inhibitoria de crecimiento medio  $CI_{50}$  para cada línea celular de las fisalinas fue 1.53, 0.54, 1.75, 0.63, 0.45, 0.48, 0.28 y 0.57  $\mu\text{g/mL}$ , la concentración inhibitoria con flavonoides fue 62.24, 22.35, 86.77, 45.08, 25.32, 25.01, 21.68 y 15.93  $\mu\text{g/mL}$  para H-460, HuTu80, DU145, MCF-7, M-14, HT-29, K562 y 3T3, respectivamente. Los índices de selectividad de las fisalinas y de los flavonoides estuvieron entre 0.16 a 17.3 y 345.27 a 1382.0, respectivamente. **Conclusiones:** Las fisalinas de las hojas de *Physalis peruviana* L con el método del radical DPPH demostraron menor actividad antioxidante que los flavonoides; las fisalinas tuvieron mayor actividad citotóxica que los flavonoides en los bioensayos de erizo de mar y líneas celulares *in vitro*.

**Palabras clave:** fisalinas, flavonoides, *Physalis peruviana* L., actividad antioxidante, actividad citotóxica.

## SUMMARY

**Objective:** To determine the antioxidant and citotoxic activity of the physalins and flavonoids *Physalis peruviana* L leaves. **Design:** Experimental. **Setting:** Faculty of Pharmacy and Biochemistry and Faculty of Biology, San Marcos Major National University; Laboratory of Research and Development “Abraham Vaisberg Wolach”, Cayetano Heredia Peruvian University. **Materiales:** Physalins and flavonoids of *Physalis peruviana* L leaves; embryos *Tetrapygus niger*; human tumoral cells lines H-460, HuTu80, DU145, MCF-7, M-14, HT-29, K562 and 3T3 fibroblasts. **Interventions:** Antioxidant activity was determined with DPPH radical scavenging method and cytotoxic activity was observed by black sea urchin bioassay and tumoral cells lines. **Main outcome measures:** Antioxidant and cytotoxic activities. **Results:** we found the percentages of radical-scavenging DPPH were 95,0% and 26,6% for physalins and flavonoids respectively; physalins and flavonoids showed cytotoxic activity starting from concentration of 10 ppm on black sea urchin bioassay; we found the percentage of cellular growth for every dilution in ever cellular line, the inhibiting concentration of average growth for each cellular line from physalins was 1.53, 0.54, 1.75, 0.63, 0.45, 0.48, 0.28 y 0.57 µg/mL, the inhibiting concentration with flavonoids was 62.24, 22.35, 86.77, 45.08, 25.32, 25.01, 21.68 y 15.93 µg/mL for H-460, HuTu80, DU145, MCF-7, M-14, HT-29, K562 and 3T3, respectively; the physalins and flavonoids selectivity index were between 0.16 to 17.32 and 345.27 to 1382.02, respectively. **Conclusions:** The *Physalis peruviana* leaves physalins showed lower antioxidant activity than flavonoids on DPPH radical scavenging method; the physalins showed greater citotoxic activity tan flavonoids on black sea urchin bioassay and cell lines *in vitro*.

**Key words:** Physalins, flavonoids, *Physalis peruviana* L., antioxidant activity, citotoxic activity.

# CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

## 1.1 Problemática

La investigación en el campo de la fitoterapia y la medicina tradicional son temas importantes en el Perú, país de inmensa riqueza en plantas medicinales: domesticadas y silvestres con potencial farmacológico (Ruiz, S., Venegas, E., Chávez, M., Eustaquio, C., 2010).

En el género *Physalis* se ha encontrado y reportado importantes metabolitos secundarios en diversas especies del género; en nuestro medio *Physalis peruviana* L., conocida como aguaymanto, es la especie más difundida. El aguaymanto es una de las frutas exóticas más promisorias que en los últimos años se ha posicionado por la calidad del fruto, su valor nutritivo y múltiples usos en: alimentación, medicina e industria. Se utiliza como recurso medicinal aprovechando raíces, frutos, tallo y hojas. Actualmente se está incrementando los estudios para aprovechar todo el potencial que ofrece el género *Physalis* (Perea, D., Rodríguez, N., Fischer, G., Velásquez, Y., 2010).

Las especies de este género han reportado altos niveles de antioxidantes y pueden ser aprovechable de manera directa o a partir de extractos (Rockenbach, I., Rodrigues, E., Cataneo, C., Gonzaga, L., Lima, A., Mancini-Filho, J., et al, 2008), los antioxidantes neutralizan la actividad nociva de los radicales libres.

Los radicales libres han sido considerados como la causa fundamental de diferentes tipos de enfermedades, incluyendo envejecimiento, enfermedad coronaria, inflamación, diabetes mellitus, reumatismo, desórdenes hepáticos, falla renal y cáncer, siendo este último un problema relevante dentro del perfil epidemiológico a nivel mundial. Para *Physalis peruviana* L. ciertos componentes como los flavonoides, los witanólidos y las fisalinas serían de

utilidad directa contra procesos inflamatorios y cancerígenos; este potencial antioxidante, citotóxico y anticancerígeno estimula el desarrollar estudios enfocados a conocer y comprender mejor la riqueza fitoquímica, el fundamento bioquímico y fisiológico de sus propiedades medicinales.

## **1.2 Formulación del problema**

¿Las fisalinas y los flavonoides de las hojas de *Physalis peruviana* L. poseerán actividad antioxidante y citotóxica?

## **1.3 Justificación teórica**

En la actualidad, el género *Physalis* está siendo objeto de estudios desde varios puntos de vista, incluidos el molecular y el fitoquímico. La principal característica del grupo es la producción de esteroides denominados witaesteroides a los cuales diversos trabajos han atribuido importantes actividades farmacológicas; las especies reconocidas son *P. alkekengi*, *P. alkekengi* var. *franchetii*, *P. angulata*, *P. ixocarpa*, *P. lanifolia*, *P. mínima*, *P. peruviana*, *P. phyladelphia*, *P. pubescens* y *P. viscosa*.

*Physalis peruviana* L. está siendo actualmente muy estudiada, por ser el principal representante de *Physalis* en Venezuela, Ecuador, Perú y Colombia, este último es el mayor productor mundial, que destina el 80% de su producción a Europa, por lo que el interés por el conocimiento y aprovechamiento de esta especie es superior a otras especies del género (Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Durango, 2013)

La valoración preliminar de la potencial actividad citotóxica de los extractos y fracciones de las hojas de *Physalis peruviana* L. servirá para avanzar y complementar la búsqueda de principios que tengan actividad farmacológica y para la generación de beneficios sociales y económicos para la comunidad a través del acercamiento a nuevas alternativas terapéuticas para el cáncer que puedan aplicarse en el país.

Sobre la base de lo señalado anteriormente y considerando que el aguaymanto se cultiva y produce en nuestro país, es conveniente investigar el efecto de los metabolitos de los extractos y fracciones de las hojas de esta especie como una alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades.

#### **1.4 Justificación práctica**

Con la presente investigación se amplía el conocimiento sobre la naturaleza fitoquímica de la hojas de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) y su actividad antioxidante y citotóxica debido a la presencia de fisalinas y flavonoides.

La utilización de las hojas, como materia prima para la industria de productos fitoterapéuticos, constituye una alternativa en el uso contra diversas enfermedades debido a su disponibilidad y generándose un valor agregado al aguaymanto dentro de su cultivo y cadena productiva.

#### **1.5 Objetivos**

##### **1.5.1 Objetivo general**

Determinar la actividad antioxidante y citotóxica de las fisalinas y de los flavonoides presentes en las hojas de *Physalis peruviana* L.

##### **1.5.2 Objetivos específicos**

- Realizar la marcha fitoquímica de las hojas de *Physalis peruviana* L.
- Realizar la extracción, aislamiento y caracterización química cualitativa de las fisalinas presentes en las hojas de *Physalis peruviana* L.
- Realizar la extracción, aislamiento y caracterización química cualitativa de los flavonoides presentes en las hojas de *Physalis peruviana* L.
- Determinar la actividad antioxidante de las fisalinas y de los flavonoides presentes en las hojas de *Physalis peruviana* L.
- Determinar la actividad citotóxica de las fisalinas y de los flavonoides presentes en las hojas de *Physalis peruviana* L.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes

Además de las propiedades nutricionales encontradas para muchas de las especies de *Physalis*, una alta proporción de ellas poseen también propiedades medicinales. Se ha demostrado que ciertos componentes como los witanólidos y las fisalinas, pueden ser de utilidad directa contra procesos inflamatorios y cancerígenos, a la vez que son hepatoprotectores y reguladores del sistema inmune (Ahmad, S., Malik, A., Yasmin, R., Ullah, N., Gul, W., Khan, P., et al., 1999).

Los estudios fitoquímicos del género han demostrado la presencia de witanólidos, esteroides, alcaloides, glicósidos y flavonoides (De Puente, L.A., Pinto-Muñoz, C.A., Castro, E.S., Cortés, M., 2011).

*Physalis peruviana* L. ha sido ampliamente empleada en medicina tradicional como agente anticancerígeno, antipirético e inmunomodulador y para el tratamiento en enfermedades como malaria, asma hepatitis, dermatitis y reumatismo.

Entre las actividades reportadas para *P. peruviana* se encuentran principalmente: actividad antiinflamatoria, antioxidante, antidiabética/hipoglicemiante y anticáncer/citotóxica. Esta última asociada directamente a witanólidos, compuestos muy comunes en esta planta (Wu, S.J., Chang, S.P., Lin, D.L., Wang, S.S., Hou, F.F., Ng, L.T., 2009; Wu, S.J., Ng, L.T., Chen, C.H., Lin, D.L., Wang, S.S., Lin, C.C., 2004; Zavala, D., Quispe, A., Posso, M., Rojas, J., Vaisberg, A., 2006).

La literatura señala que de *Physalis peruviana* se han aislado numerosos compuestos, tales como ticloidina, figrina (Basey, K., McGaw, B.A., Wolley, J.G., 1992), 28-hidroxiwitanólido y 4- $\beta$ -hidroxiwitanólido E (Baumann, T.W., Meier, C.M., 1993; Dinan, L.N., Sarker, S.D., Sik, V., 1997), witanólidos,

witafisanólidos y viscosalactona (Ahmad, S., Malik, A., Yasmin, R., Ullah, N., Gul, W., Khan, P., et al., 1999).

El extracto acuoso de *Physalis peruviana* exhibe potente actividad citotóxica (Won, S.J., Chiang, H.C., Kan, W.S., Lin, M.T. 1998) sobre células de melanoma B16-F10. El extracto etanólico demostró potente efecto citotóxico contra células Hep G2 y su mecanismo de acción está relacionado con la vía apoptosis mediada por mitocondria (Wu, S.J., Ng, L.T., Chen, C.H., Lin, D.L., Wang, S.S., Lin, C.C., 2004; Wu, S.J., Ng, L.T., Lin, D.L., Huang, S.N., Wang, S.S., Lin, C.C., 2004). El extracto también mostró potente inhibición de la xantina oxidasa y actividad peroxidación antilipídica (Quispe-Mauricio, A., Callacondo, D., Rojas, J., Zavala, D., Posso, M., Vaisberg, A., 2009).

Los extractos de las hojas de esta especie han demostrado importantes actividades antibióticas, antioxidantes y antiinflamatorias. El extracto de las hojas y tallos contiene fisalinas y glicósidos que son capaces de inhibir el crecimiento de células tumorales (Quispe-Mauricio, A., Callacondo, D., Rojas, J., Zavala, D., Posso, M., Vaisberg, A., 2009).

En el 2006 se estudió el efecto de los extractos etanólicos de hojas y tallos de *Physalis peruviana* L. encontrándose que fueron más citotóxicos que el 5-fluorouracilo en las líneas colo-205 (adenocarcinoma de colon humano) y K-562 (leucemia mieloide crónica) y menos citotóxicos en la línea 3T3 (fibroblastos normales de embrión de ratón) en relación con el 5-fluorouracilo (Zavala, D., Quispe, A., Posso, M., Rojas, J., Vaisberg, A., 2006).

Se ha determinado la actividad citotóxica de los extractos etanólicos de tallos y hojas de *Physalis peruviana* L en líneas tumorales HT-29 (adenocarcinoma colorectal) y PC-3 (adenocarcinoma de próstata), debido a su gran prevalencia en nuestro país; así también en la línea celular K-562 (leucemia mieloide crónica) y su efecto tóxico frente a la línea celular VERO (fibroblastos de riñón de mono verde africano), comparándolo a controles positivos como los antineoplásicos: cisplatino y 5-FU, encontrándose que los

extractos tienen mayor citotoxicidad en las líneas tumorales y menor citotoxicidad que los controles en la línea VERO (Ahmad, S., Malik, A., Yasmin, R., Ullah, N., Gul, W., Khan, P.M., et al., 1999).

Otros autores han aislado cierto número de fisalinas, compuestos bioactivos del género *Physalis*. Fisalina B y fisalina F, mas no fisalina D, inhiben el crecimiento celular de leucemia humana *in vitro*. Los compuestos bioactivos mayoritarios, fisalinas (B, D y F) (Magalhaes, H.I., Veras, M.L., Torres, M.R., Alves, A.P., Pessoa, A.D., Silveira, E.R., et al., 2006) y glicósidos (tales como mirecetina-3-O-neohesperidósido) (Ismail, N., Alam, M., 2001) demostraron actividad anticancerígena sobre líneas celulares HA 22T (hepatoma), HeLa (cuello uterino) y KB-16 nasofaríngeo.

## **2.2 Bases teóricas**

### **2.2.1 Familia Solanaceae**

La familia Solanaceae es una de las más grandes y ampliamente distribuídas familias dentro del grupo de las angiospermas, posee alrededor de 3000 a 4000 especies, subdivididas en 96 géneros, muchos de los cuales son endémicos de determinadas regiones del mundo.

La mayor riqueza taxonómica se encuentra en regiones tropicales de América latina con cerca de 40 a 50 géneros.

Muchas de sus especies se cultivan como fuente alimenticia tales como *Lycopersicum sculentum* L., *Solanum tuberosum* L., *Solanum melongena* L. y *Capsicum sp.*; otras son cultivadas como plantas ornamentales entre ellas las especies de los géneros *Browallia*, *Brunfelsia*, *Cestrum*, *Datura*, *Nicotina*, *Salpiglossis*, *Solanum*, *Solandra*. Además hay especies cultivadas con interés medicinal como *Atropa belladonna* L., *Datura sp.*, *Nicotiana sp* (Douglas, A., 2011).



### **2.2.2. Género *Physalis***

El género *Physalis* (Solanaceae) constituido por especies de carácter arbustivo, incluye cerca de 90 a 120 especies, las cuales se encuentran distribuidas por varios continentes del mundo, principalmente en regiones tropicales y subtropicales.

Con origen en el idioma griego el nombre *Physalis* viene de la palabra “phusa” que significa burbuja o de la vejiga y está directamente relacionada con el cáliz que encierra sus frutos que en la mayoría de las especies es comestible (Tomassini, T.C.B., et al., 2002).

Formado por especies de renombrado valor etnobotánico, nutracéutico y medicinal, las plantas de este grupo son utilizadas para diversos fines, entre las que destacan la utilización de los frutos de *P. philadelphica*, *P. peruviana*, *P. grisea*, *P. chenopodifolia*, *P. coztomatl* y *P. angulata* como fuente alimenticia (Damu, A.G., et al., 2007).

La principal característica del grupo es la producción de esteroides denominados witaesteroides (witanólidos, wita-fisalin, acnistinas, ixocarpalactonas, perulactonas y fisalin), los cuales son originados a partir de la vía del ácido mevalónico y posee gran interés farmacológico; dentro del género varias son especies productoras de estas sustancias especialmente, *P. angulata*, *P. P. alkekengi*, *P. alkekengi* var. *franchetii* *Ixocarpa*, *P. lanifolia*, *P. mínima*, *P. peruviana* *P. phyladelphia*, *P. pubescens*, *P. viscosa* (Tomassini, T.C.B., et al., 2000).

### **2.2.3 Metabolitos secundarios característicos del género *Physalis***

Estudios químicos de ejemplares del género *Physalis* apuntaron a la existencia de varias clases de compuestos activos que ocurren naturalmente incluidos flavonoides (3-O-neoesparidosedio-mirecetina), alcaloides (acetil colina, figrina, higrina, ornitina, tigloidina, N-metilpirrolidinalgrina en hojas de

*Physalis peruviana*, calisteginas en diferentes estructuras de *P. alkekengi* L var *francheti*, *P. philadelphica* Lam., *P. ixocarpa* Brot e *P. peruviana* L.), triterpenoides ( $\beta$ -amirina en semillas de *P. alkekengi* L.), ceramidas (1,3,4-trihidroxí-2-2'-hidroxitetraacosanoilamino-9-octadecano en hojas y estambres de *P. philadelphica*); fenilpropanoides (ácido clorogénico), innumerables clases de ácidos grasos en semillas y muchos tipos de diferentes esteroides (fitoequidizos, más allá de los witaesteroides) algunos de los cuales sin precedentes (Su, B.N., et al, 2002; Qiu, L., et al, 2008)

Entre todos los grupos de los compuestos citados o que despierta mayor interés debido a sus propiedades farmacológicas son los witaesteroides, una de las clases de sustancias bioactivas caracterizadas como lactonas esteroidales que reproducen el esqueleto intacto del ergostano (Figura 1), siendo en su mayoría polioxigenados (Tomassini, T.C.B., et al., 2000).

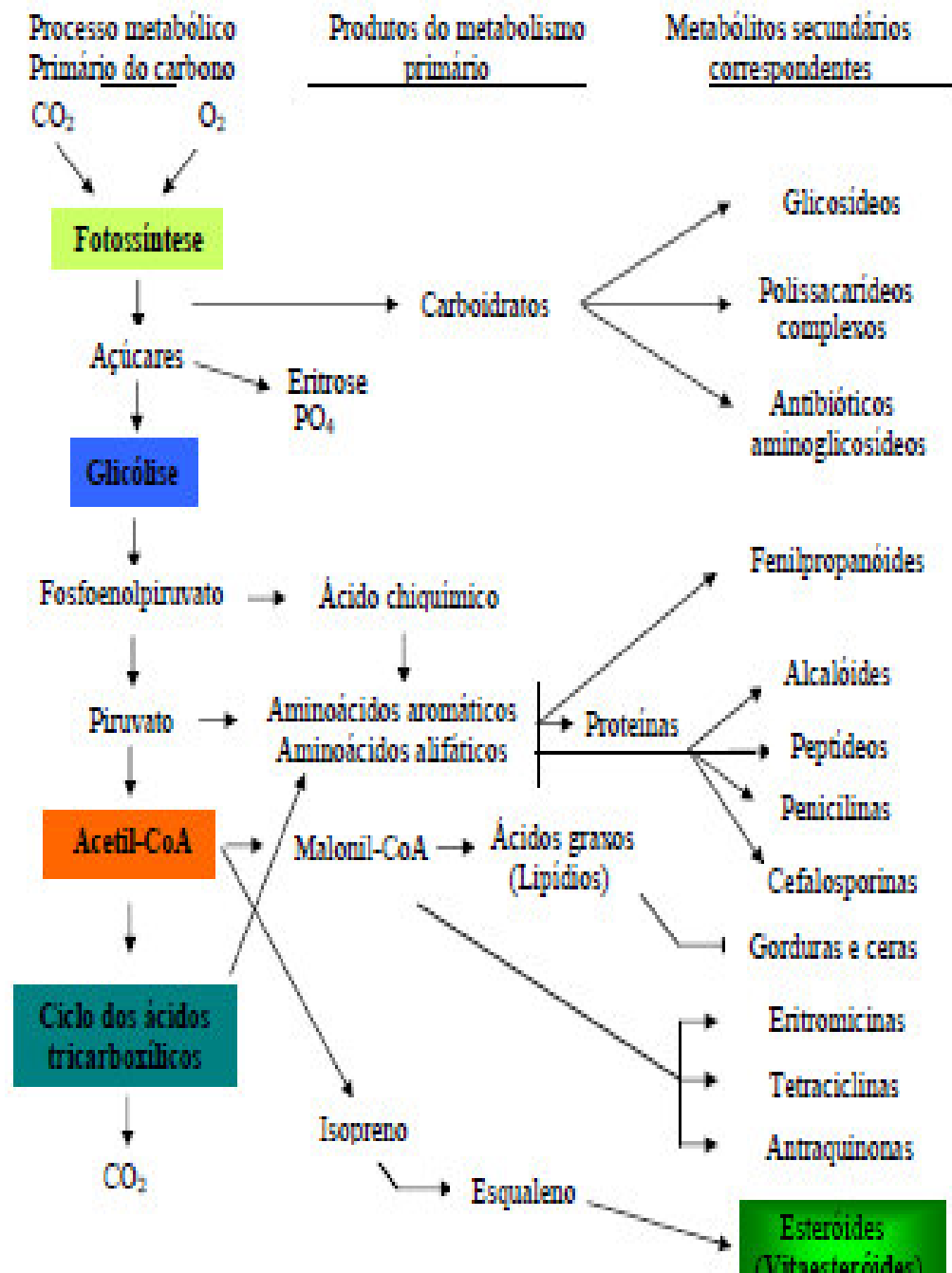


Figura 1. Biosíntesis de algunos metabolitos secundarios en las especies del género *Physalis*

Fuente: Ferreira (2005)

Desde el punto de vista estructural los metabolitos presentan una función lactónica en el carbono 26, los witaesteroides, tienen la capacidad de generar una gran variedad de estructuras, las cuales son subdivididas en ocho grupos principales, siendo ellos los witanólidos, witanólidos modificados (anillos A o D aromáticos), witafigalinas, acnistinas, ixocarpalactonas, perulactonas y figalinas.

Estas clases de witaesteroides están presentes de forma más expresiva en especies pertenecientes a la familia Solanaceae, sin embargo, pueden ocurrir con menor frecuencia en las familias Fabaceae y Taccaceae (Tomassini, T.C.B., et al., 2002; Veras, M.L., et al, 2004; Magalhaes, H.I.F., 2005).

#### **2.2.4 *Physalis peruviana* L**

Descrita por primera vez por Linnaeus en 1753, es conocida comúnmente como “cape gooseberry” o grosella del cabo. Es una planta herbácea, erecta, perenne en zona tropicales y anual en zonas templadas. Las ramas son acanaladas, a veces violáceo y con hojas opuestas, alternadas acorazonadas (Figura 2).

La especie *Physalis peruviana* L. conocida en nuestro medio como aguaymanto, pertenece a la familia Solanaceae y al género *Physalis*, cuenta con más de 80 variedades que se encuentran en estado silvestre y que se caracteriza porque sus frutos están encerrados dentro de un cáliz o cápsula. Es originaria del Perú, en donde es la especie más conocida de este género. Colombia es el primer productor mundial de uchuva, seguido por Sudáfrica. Se cultiva de manera significativa en Zimbabwe, Kenya, Ecuador, Perú, Bolivia y México (Fischer, G., Amanza, P., 1993).

En el Perú, se desarrolla entre los 1500 a 3000 msnm. Es una planta perenne y arbustiva que normalmente crece hasta una altura de 1 a 1.5m y su fruto globoso es una baya que contiene de 100 a 300 semillas (Flórez, V., Fischer, G., Sora, A., 2000).

Esta especie se conoce con diversos nombres comunes de acuerdo a su procedencia.

**Cuadro 1. Nombres comunes de *Physalis peruviana* L.**

**Fuente: Medina (2012)**

<b>País</b>	<b>Nombre Común</b>
<b>Bolivia</b>	“Awei llamantu”, “Capulí”, “Motojobobo embolsado”, “Ruru chinchí chinchí”
<b>Chile</b>	“Bolsa de amor”, “Capulí”
<b>Colombia</b>	“Uchuva”, “Uchuba”, “Uchubo”, “Alquenque”, “Buchuvba”, “Capulí”, “Guachuvo vejigón”, “Guchuba”, “Guchero”, “Tomate”, “Vejigón”
<b>Ecuador</b>	“Uvilla”
<b>En inglés</b>	“Golden Berry” o “Cape gooseberry”
<b>Perú</b>	“Aguaymanto”, “Capulí”, “Tomate de bolsa”
<b>Venezuela</b>	“Cuchuva”, “Huevo de sapo”, “Topotopo” y “Topo-topo”

*Physalis peruviana* L. elabora en su biogénesis los witanólidos y las wita fisalinas. Sintetiza fisalinas que se definen como lactonas sesquiterpénicas esteroideas, con estructura bastante compleja, presentan una γ lactona, además de la lactona original de la cadena. Estas moléculas también han sido objeto de numerosos estudios en el campo de la medicina, con resultados promisorios como inmunoestimulantes, con actividad citotóxica para varios tipos de células cancerígenas y leucémicas, además de poseer propiedades antimicrobianas (Tomassini, T.C.B., et al., 2000; Magalhaes, H.I.F., 2005; Perez-Castorera, A.L., et al, 2004).

En el cuadro 2 se indica algunas actividades reportadas de los extractos, fracciones o metabolitos presentes en órganos de la especie *Physalis peruviana* L.

**Cuadro 2. Actividades biológicas reportadas para los extractos de cada órgano de *Physalis peruviana* L.**

**Fuente: Medina (2012)**

Parte de la planta	Actividad reportada	Extracto, fracción o metabolito	Referencia
Planta entera	Actividad antihepatoma	Extracto etanólico	Wu et al., 2004a.
	Inducción de apoptosis en células humanas, antitumoral	Extracto etanólico	Wu et al., 2004b; Wu et al., 2006; Zavala et al., 2006.
	Actividad antioxidante	Extracto etanólico	Wu et al., 2005; Wu et al., 2006.
Hojas	Actividad antiinflamatoria y antioxidante	Extracto etanólico	Wu et al., 2006.
	Actividad antihepatotóxica	Extracto acuoso	Arun y Asha, 2007.
	Apoptosis en células cancerígenas	Extracto denominado SCEPP-5.	Wu et al., 2009.
Partes aéreas	Actividad citotóxica contra células cancerígenas (Pulmón, mama, hígado)	Witanólidos	Lan et al., 2009.
Cálices	Actividad antiinflamatoria	Fracción denominada Pp-D28-LF	Franco et al., 2007.
Frutos	Actividad antimicrobiana	Jugo de pulpa frutos	Bernal y Correa, 1998.
	Hipoglicemiante, antioxidante	Fruto entero, Extracto hidroalcohólico,	Rodríguez y Rodríguez, 2007; Bula y Cruz, 1993; García y Súa, 1997; Mora, 2008; Pinto et al., 2009; Ramadan y Mörsel, 2003; Rodríguez y Rodríguez, 2007
	Actividad antidiabética	Extracto	Mora et al., 2008
	Leve actividad antiinflamatoria	Jugo de los frutos	Pardo et al., 2008.



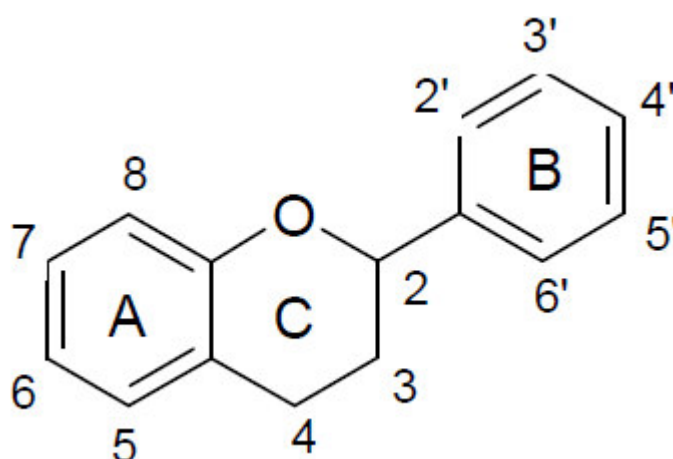


**Figura 2. *Physalis peruviana* L.**

**Fuente: *Physalis peruviana* L - Cape Gooseberry (Solanaceae Images) Aphotoflora; exotic-plants.de**

### 2.2.5 Flavonoides

Son metabolitos secundarios muy numerosos y ampliamente distribuidos. Se conoce como diez clase de flavonoides, todos contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema C6-C3-C6, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C. Estos flavonoides suelen encontrarse bajo la forma de glicósido con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa; es frecuente que diferentes azúcares se hallen unidos a una misma aglicona y en diferentes posiciones.



**Figura 3. Estructura básica de los flavonoides**

**Fuente: Valdameri (2008)**



A partir de esta estructura representada en la Figura 3, varias combinaciones pueden ser formadas principalmente con la presencia de hidroxilos y metoxilos. Entre los flavonoides las principales clasificaciones son: flavona, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianinas e isoflavonas (Moon, Y., Morris, M., 2006)

Las diferencias entre cada uno de estos grupos están relacionadas a una variación en el número y la disposición de hidroxilos, también como su naturaleza. Por ejemplo el color vibrante de los flavonoides (flavonas y antocianinas) actúa como atractivo para los insectos polinizadores, así como protectores de las células vegetales al secuestrar especies reactivas de oxígeno producidas por la radiación UV indispensable para la fotosíntesis (Pietta, P., 2000).

Los flavonoides han sido empleados para la reducción de la fragilidad capilar, protección frente a estados tóxicos agudos, en terapéutica estrogénica e inflamatoria por su acción similar a la cortisona. Además son usados como antioxidantes, antivirales, antidiarréicos, antihelmínticos y citostáticos (Ruiz, S., Venegas, E., Chávez, M., Eustaquio, C., 2010).

Los flavonoides encontrados en *Physalis* son variados, pudiendo estar en forma de glicósidos de flavonas y flavonoles. En las hojas de *Physalis peruviana* L., han sido encontrados flavonoles di y triglicosados, como el campferol-3-O-rutinosídeo, campferol-3-O-rutinosídeo-7-O-glicosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo-7-O-glicosídeo (Eliger, C., Eash, J., Waiss, Jr., 1992).

En los cálices de *Physalis alkekengi* L., fueron obtenidos flavonoles y flavonas tanto en forma de aglicona como glicosilados (Qiu, L., Zhao, F., Jiang, Z., Chen, L., Zhao, Q., Liu, H., et al., 2008).

En el extracto de la parte aérea de *Physalis minima* L. fueron aisladas flavonas metoxiladas y metiladas (Serr, N., 1998).

En *Physalis angulata*, fue reportada la ocurrencia de un flavonol glicosilado, conocido con el nombre de miricetina 3-O-neoesperidosídeo, que posee actividad citotóxica contra células de cáncer (Ismail, N., Alam, M., 2001).

#### **2.2.6 Witaesteroides**

Los compuestos tipo witaesteroides son los más reportados especialmente para la especie *Physalis peruviana*. Los witaesteroides junto con capsaicinoides y saponinas esteroidales, representan metabolitos secundarios específicos de algunos taxones de Solanáceas. Sin embargo, los witaesteroides se constituyen en los metabolitos más abundantes y reconocidos de la familia Solanaceae, siendo *Physalis* el género que contiene mayor cantidad de witanólidos y compuestos relacionados, aunque éstos también se presentan con gran frecuencia en el género *Whitania*. Considerando el nivel de oxidación biogenética, el género *Physalis* es el más evolucionado de la familia Solanaceae, contando con la presencia de metabolitos polioxigenados como los witaesteroides, que presentan funciones lactona, epóxido y enona (Tomassini, T.C.B., et al., 2000; Medina, D.P., 2012).

Los witaesteroides se clasifican en 8 grupos de acuerdo a la estructura formada por su función lactónica en C-26 (Tomassini, T.C.B., et al., 2000).

En la figura 4 se presentan los esqueletos básicos de cada tipo.

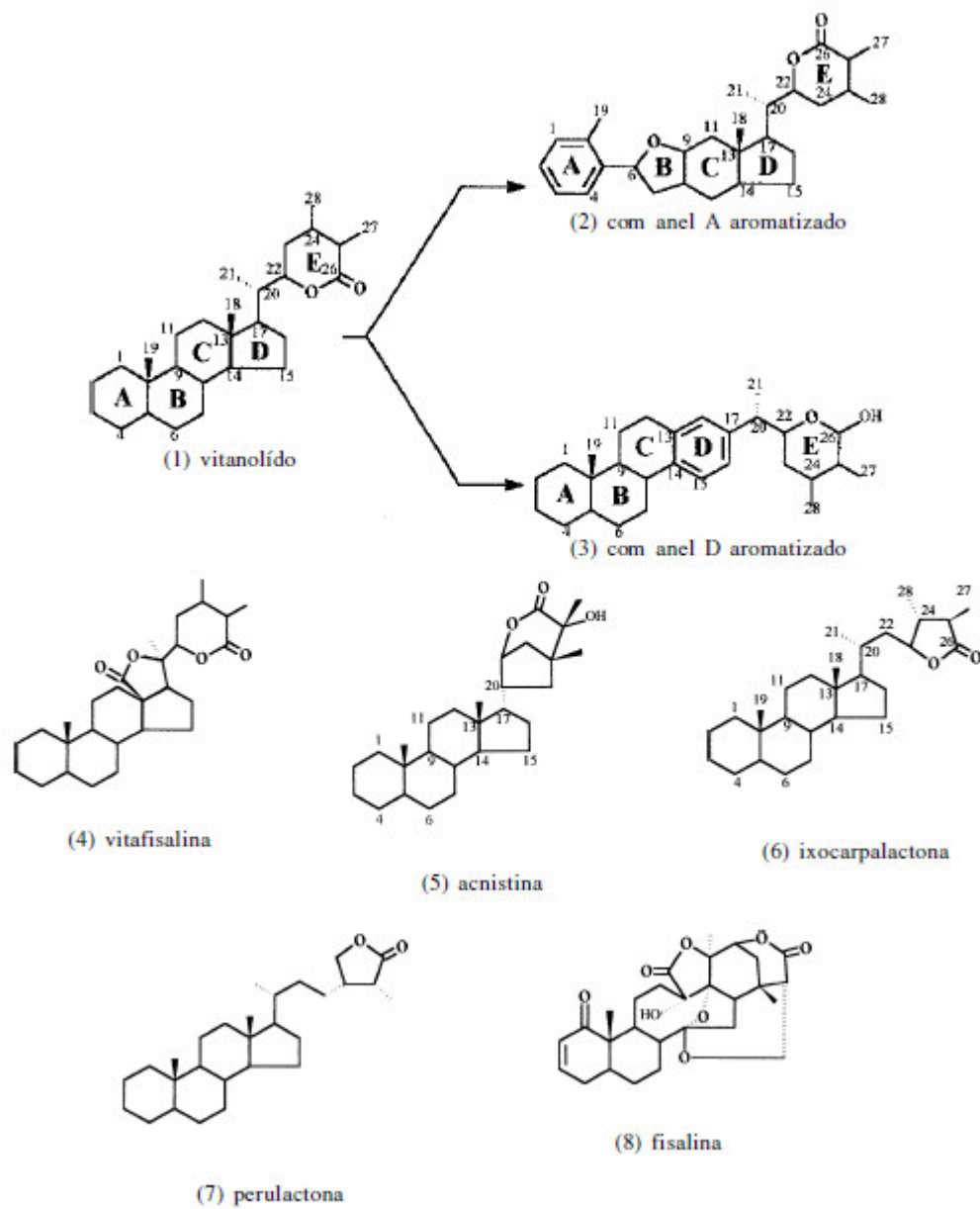
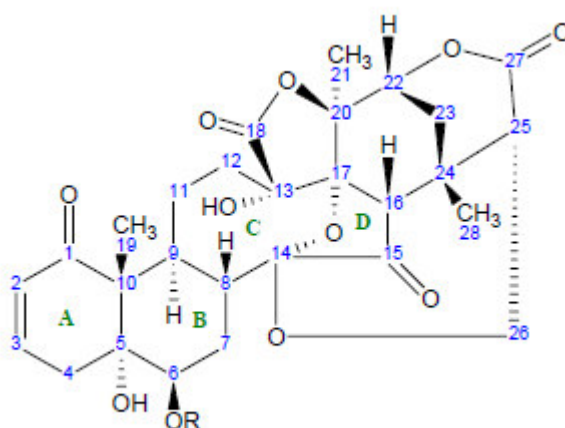


Figura 4. Esqueleto básico de witaesteroides.

Fuente: Tomassini et al. (2000)

Dentro de las actividades biológicas reportadas para los witaesteroides se encuentran antiinflamatoria, inmunomoduladora, antitumoral, tripanosomicida, entre otras (Tomassini, T.C.B., et al., 2000).

Las fisalinas son witaesteriodes, moléculas estructuralmente complejas porque además de presentar la lactona típica de witaesteroides, tienen una  $\gamma$ -lactona fusionada al anillo D. Son derivados esteroidales del tipo 13,14-seco-16,24 ciclo ergostano con carbonilo en C-15, como se observa en la figura 5 (Medina, D.P., 2012).



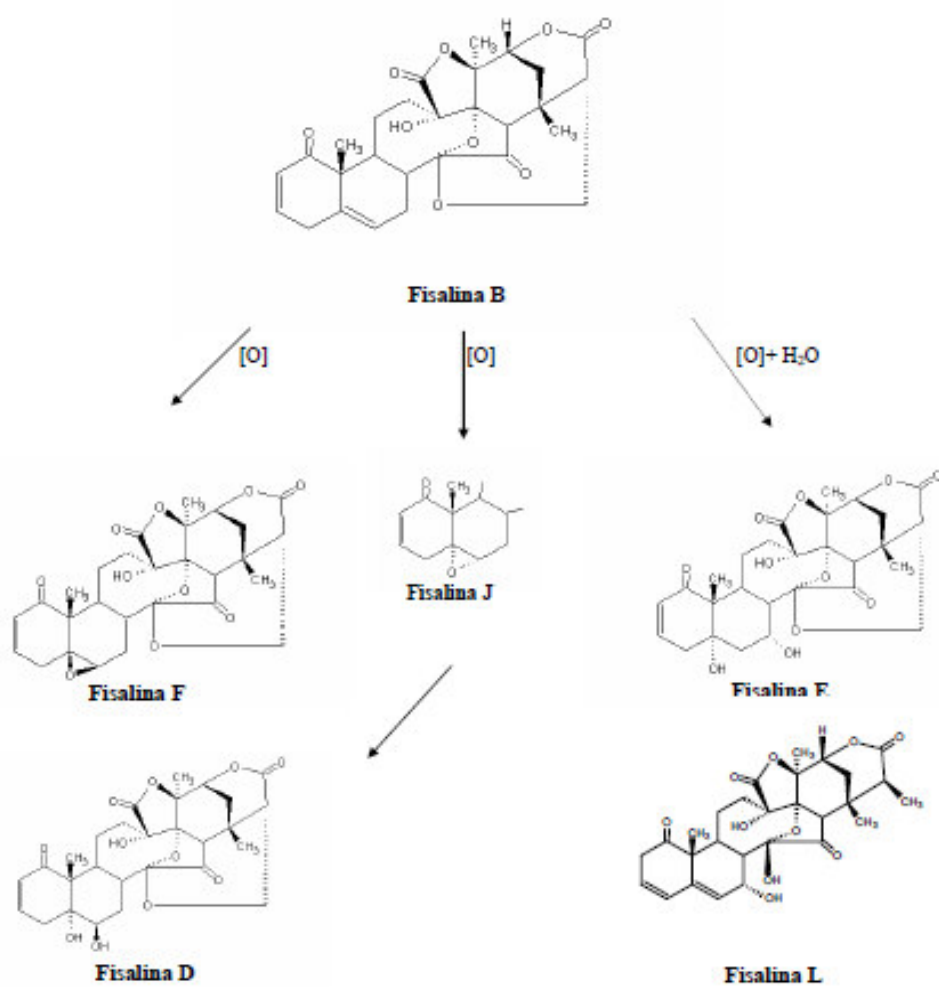
**Fuente: Ferreira (2005)**

Son sustancias inmunosupresoras utilizadas para evitar respuesta del sistema inmune por ejemplo cuando se hacen trasplantes de órganos, cuando se presentan alergias y enfermedades autoinmunes. Los principales compuestos activos son las fisalinas A, B, D, F y glucósidos (De Puente, L.A., Pinto-Muñoz, C.A., Castro, E.S., Cortés, M., 2011).

La fisalinas pertenecen al grupo de los compuestos C-28 ergostano: 13,14-seco-16,24-cicloesteroide derivado teniendo las características de: a) Dos lactonas gamma y delta en posición 13-20 y 22-24 b) una cetona insaturada alfa beta en el anillo A; c) un anillo éter entre los carbonos 14 y 17; d) una cetona en C-15; e) un grupo alfa hidroxilo en el C-13 y f) opcionalmente un puente oxirano entre los carbonos 14-27. La característica principal de estos esteroides es la presencia de un esqueleto 13,14-seco-16,24 ciclowitanólido (Tomassini, T.C.B., et al, 2002).

Diecinueve fisalinas (A hasta S) son conocidas y divididas en 8 quimiotipos: a) Quimiotipo I es representado por fisalinas A y C , b) Quimiotipo II por fisalinas L, M y O, c) Quimiotipo III contiene a las fisalinas B, D, E, F, H, I, J y N, d) Quimiotipo IV por fisalina G, e) Quimiotipo V por fisalina K y Q, f) Quimiotipo VI fisalina P, g) Quimiotipo VII es representado por fisalina S y h) Quimiotipo VIII por fisalina R. Fisalina A, B y Q corresponden a las matrices de los esqueletos que conducen a la biosíntesis de las otras sustancias relacionadas. Fisalina B es el precursor biogenético de la mayoría de las fisalinas (Tomassini, T.C.B., et al, 2002).

Las fisalinas pueden ser originadas en las plantas del género *Physalis* a partir de reacciones de oxidación y/o hidratación (Figura 6) que ocurriría en la propia planta (Ferreira, H.I., 2005).



Fonte: Adaptado de Row et al. (1980)

Figura 6. Posibles rutas biogénicas para la formación de fialinas.

Fuente: Ferreira, H.I. (2005)

## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

### 3.1 Material biológico

- Las hojas de *Physalis peruviana* L. fueron recolectadas en el Distrito de Primorpampa, Provincia de Yungay, Región Ancash a 3 080 msnm en el mes de agosto del 2012. La clasificación taxonómica de la planta fue realizada en el Museo de Historia natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se procedió a la limpieza de la planta y separación de las hojas. Para el secado de las hojas se llevó a la estufa a una temperatura de 40°C hasta peso constante, luego se pulverizó en un molino de cuchillas y se guardó en un recipiente limpio y seco para utilizarlo posteriormente.
- Erizos de mar (negros) *Tetrapyrgus niger* se recolectaron en el balneario de Ancón en el mes de octubre y trasladados rápidamente al laboratorio en agua de mar a una temperatura entre 10°C y 15°C.
- Las líneas celulares ATCC fueron proporcionadas por el Laboratorio de Investigación y Desarrollo “Abraham Vaisberg Wolach” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:
  - 3T3 (fibroblastos normales de embrión de ratón)
  - H-460 (carcinoma de pulmón tipo células no pequeñas, humano)
  - HuTu80 (carcinoma de duodeno, humano)
  - DU-145 (carcinoma de próstata, humano)
  - MCF-7 (adenocarcinoma de mama, humano)
  - M-14 (melanoma amelanótico, humano)
  - HT-29 (adenocarcinoma de colon, humano)
  - K-562 (leucemia mieloide crónica, humana)

### 3.2 Equipos, materiales y reactivos

#### 3.2.1 Equipos

- Estufa
- Molino de cuchillas

- Evaporador rotatorio con baño maría
- Lámpara de luz ultravioleta
- Balanza analítica digital Mettler Toledo
- Espectrofotómetro Ultravioleta Perkin Elmer
- Microscopio (1000X)
- Estereoscopio Belnet
- Incubadora Biochemical Incubator ZSD-1090
- Cromatógrafo líquido Elite Lachrom
- Espectrofotómetro infrarrojo Perkin Elmer
- Lectora de microplacas Bio-Rad
- Cabina de flujo vertical Baker Company
- Incubadora de CO<sub>2</sub> Nuaire
- Microscopio invertido de contraste de fases Diavert
- Contador Coulter Counter

### **3.2.2 Materiales**

- Beakers, matraces, pipetas, frascos y fioles ámbar, viales
- Equipo de cromatografía en capa fina y papel
- Papel filtro
- Pipetas pasteur
- Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- Tubos de ensayo
- Placas de cultivo de células
- Micropipetas

### **3.2.3 Reactivos**

- Alcohol etílico 96°
- Alcohol metílico
- Ácido acético glacial
- Butanol
- Amoníaco



- Ácido clorhídrico
- Magnesio metálico
- N-hexano
- Acetato de etilo
- Diclorometano
- Cloroformo
- Vainillina
- Ácido sulfúrico
- 2, 2-difenilpicrilhidrazil (DPPH)
- Dimetilsulfóxido
- Ácido tricloroacético 10%
- Sulforodamina B
- Ácido acético 1%

### **3.3 Marcha fitoquímica del extracto de las hojas (Ruiz, S., et al, 2010)**

Se realizó la identificación preliminar de los metabolitos secundarios, para lo cual se partió de un extracto etanólico y con los ensayos correspondientes a cada uno. Se analizó la presencia / ausencia de: esteroides, flavonoides, taninos y alcaloides.

### **3.4 Extracción y aislamiento de las fisalinas (Tomassini, T., et al, 2002)**

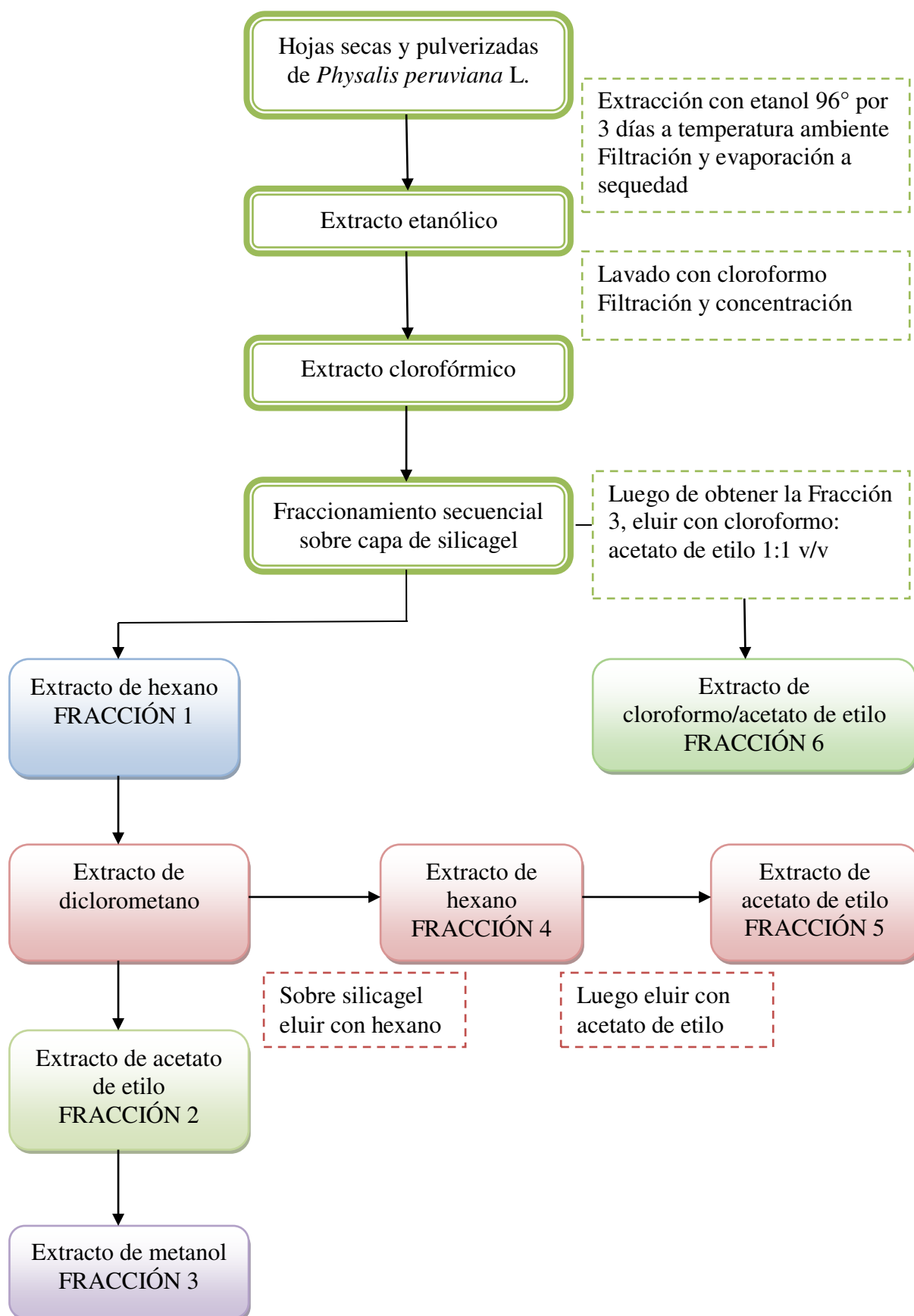
100 g de hojas secas y pulverizadas de *Physalis peruviana* L. se colocaron en un recipiente adecuado con 1000 mL de etanol 96% para la extracción durante 3 días a temperatura ambiente. Se filtró y el extracto obtenido se concentró a sequedad a 35°C. El material siruposo obtenido fue lavado con cloroformo en una proporción de 3 a 5 veces del peso obtenido. La fracción soluble fue parcialmente evaporada y colocada sobre una capa de silicagel para filtración utilizando, de manera secuencial: hexano (Fracción 1),

diclorometano, acetato de etilo (fracción 2) y metanol (fracción 3) como solventes extractores.

La fracción diclorometánica obtenida fue reducida y tratada nuevamente sobre silica gel, eluyendo con hexano (fracción 4) y acetato de etilo (fracción 5).

El material obtenido luego de la filtración secuencial fue nuevamente tratado con una mezcla de cloroformo : acetato de etilo 1:1 v/v. (fracción 6).

Cada fracción se concentró y evaporó a sequedad, los cuales se reconstituyeron en metanol para los ensayos de cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta performance (HPLC).



**Figura 7. Diagrama de flujo para la extracción de fisalinas en hojas de *Physalis peruviana* L**

## CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Las seis fracciones se analizaron mediante cromatografía de capa delgada bajo las siguientes condiciones:

### Fase estacionaria:

Cromatofolio de sílica gel

### Fase móvil:

Hexano : Acetato de etilo (3:7 v/v)

### Revelador:

Solución *a*: solución etanólica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%

Solución *b*: solución etanólica de vainillina al 1%

Aspersar con *a* luego con *b*. Calentar a 110°C hasta detección.

### Detección:

Zonas rosadas a rojizas a la luz visible.

## CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE

Las seis fracciones se analizaron por cromatografía HPLC para identificación por tiempo de retención TR.

Se utilizaron dos sistemas con las condiciones cromatográficas (Setiawan, D., Sumpena, Y. 2008; Shi, R., Jia, L., Sun, Q., Yu, D. 2008). descritas en el cuadro 3.

**Cuadro 3. Condiciones cromatográficas para análisis de fisalinas por HPLC**

	Sistema 1	Sistema 2
Fase estacionaria	Columna C18 Bondapak TM o equivalente	Columna C18 (200mm×4.6mm, 5µm) Diamosil o equivalente
Fase móvil	Metanol:Agua (28.5 : 71.5)	Metanol : Ácido acético glacial 0.2% (45 : 55)
Flujo	1.5 mL/min	1.0 mL/min
Longitud de onda	254 nm	220 nm
	<b>Tiempos de retención TR (minutos)</b>	
Fisalina D	3.70	13.00
Fisalina B	11.20	-
Fisalina A	-	18.00

### 3.5 Extracción y aislamiento de flavonoides (Nagai, A. 2012)

Se colocaron 50 g de hojas pulverizadas en un frasco ámbar con 200 mL de etanol 96°, dejándose en maceración por 72 horas. Se filtró y se concentró a sequedad.

#### **CROMATOGRAFÍA DESCENDENTE EN PAPEL**

Se procedió a la separación mediante cromatografía descendente en papel bajo las siguientes condiciones:

**Fase estacionaria:** papel Whatman N°1 de 12 x 30 cm

**Fase móvil:** Sistema de solvente BAW (n-butanol : ácido acético : agua 4 : 1 : 5 v/v) el cual se preparó el día anterior y utilizándose la fase superior.

El desarrollo se efectuó en una cámara de desarrollo cromatográfico (sistema descendente).

**Revelador:** Luz UV y vapores de amoníaco + luz UV.

Se marcaron, separaron las fracciones visualizadas y se eluyeron en metanol.

Se procedió a la identificación de las fracciones obtenidas con la reacción de Shinoda.

#### **ESPECTROFOTOMETRÍA UV**

Se determinó el espectro ultravioleta de las fracciones de flavonoides obtenidas mediante barrido.

### 3.6 Actividad antioxidante mediante el ensayo de DPPH (modificado de Castro, A. 2011)

#### ***Solución de DPPH***

Se pesó 2 mg del reactivo 2, 2-difenilpicrilhidrazil (DPPH) en una fiola ámbar de 100 mL. Se disolvió y se llevó a volumen con metanol. Se preparó inmediatamente antes de su uso. Concentración: 20 µg/mL

### **Solución control de vitamina C**

En una fiola ámbar de 100 mL se colocó 2,4 mg de vitamina C, se disolvió y se llevó a volumen con metanol.

### **Solución madre de fisalinas**

De la fracción de fisalinas se tomó el equivalente a 6 mg y se agregó 10 mL de metanol (Solución madre).

### **Solución madre de flavonoides**

De la fracción de flavonoides se tomó el equivalente a 6 mg y se agregó 10 mL de metanol (Solución madre).

Preparar las siguientes diluciones:

<b>Diluciones fisalinas</b>	A	B	C	D	E
Solución madre de flavonoides (mL)	4,0	2,0	1,5	1,0	0,5
Metanol (mL)	0,0	2,0	2,5	3,0	3,5
Concentración (ug/mL)	600	300	225	150	75

<b>Diluciones flavonoides</b>	A	B	C	D	E
Solución madre de flavonoides (mL)	4,0	2,0	1,5	1,0	0,5
Metanol (mL)	0,0	2,0	2,5	3,0	3,5
Concentración (ug/mL)	600	300	225	150	75

En tubos de 10 mL y por triplicado:

De la solución DPPH se colocó 0,8 mL

De cada dilución A, B, C, D y E colocar 0,8 mL

En tubos de 10 mL:

De cada solución se preparó un blanco colocando 0,8 mL de la dilución.  
Se preparó un calibrador colocando 0,8 mL de metanol.

Se agregó 1,6 mL de Solución de DPPH a cada tubo de ensayo de calibrador, DPPH, diluciones y blancos, dejando en la oscuridad por 20 minutos y leyendo a 517 nm en el siguiente orden:

- Calibrador
- DPPH
- Diluciones + DPPH (de menor a mayor concentración)
- Blanco al final de cada dilución

### **3.7 Actividad citotóxica por bioensayo de citotoxicidad en erizos de mar (Castañeda, B. 2003; Castro, A. 2011)**

El bioensayo de citotoxicidad en erizos de mar es un método que permite determinar la actividad citotóxica de diversos compuestos químicos, utilizando para ello los embriones de erizos recientemente fecundados in vitro. También evalúa la genotoxicidad, embriotoxicidad y teratogenicidad de diferentes sustancias químicas. Se utilizó la técnica estandarizada por el Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **Obtención de gametos**

Se colocaron los erizos adultos en placas Petri, se abrió cuidadosamente por la parte dorsal, con ayuda de una tijera de disección, cortando en circunferencia para no dañar los gametos. El sexo del animal se determinó al observar el color de los gametos. Los óvulos son color granate y esperma cremoso. Se toman las gónadas con ayuda de una pinza y se colectan los ovocitos granates para depositarlos en un beaker con 400 mL de agua de mar fría hasta que se tiñera a un color púrpura, las gónadas se agitan suavemente para lograr su liberación. Se utilizó un oxigenador para mantener los óvulos viables. Se lavaron los ovocitos y se decantó el agua sobrenadante con la finalidad de remover restos de tejidos y reemplazándola con agua de mar fresca, doblemente filtrada, hasta 250 mL. Los ovocitos

lavados están listos para la fertilización. Los espermatozoides activos, a diferencia de los huevos, son viables sólo por un tiempo limitado en agua de mar. En una placa petri se colocan las gónadas masculinas de los erizos de mar. Los espermatozoides activos, a diferencia de los huevos, son viables sólo por tiempo limitado en agua de mar (de preferencia colocar las gónadas completas, sin maltratarlas).

### **Fertilización**

Se agregó 11 gotas de esperma con ayuda de una pipeta Pasteur, evitando posibles contaminaciones, al beaker que contiene el agua de mar filtrada más los ovocitos. Se agitó cuidadosamente para que ocurra la fecundación. La fecundación se comprobó mediante observación, al microscopio, de la membrana de fertilización.

### **Preparación de las muestras**

Para la fracción de fisalinas se colocó 5 mg en un vial y se adicionó 10  $\mu$ L de un disolvente apolar: dimetilsulfóxido DMSO. Se agregó 0,5 mL de agua de mar filtrada.

Para la fracción de flavonoides se colocó 5 mg en un vial y se agregó 0,5 mL de agua de mar filtrada.

A partir de estas soluciones stock se tomaron 0,5  $\mu$ L; 1,0  $\mu$ L y 3,0  $\mu$ L y se colocaron en viales, por triplicado, para luego agregarles 1 mL de agua de mar doblemente filtrada que contenga los huevos fecundados de erizo de mar, que determinará concentraciones de 5 ppm, 10 ppm y 30 ppm respectivamente.

Se prepararon dos tipos de controles: control para fisalinas, donde cada vial contendrá 1 mL de agua de mar doblemente filtrada, con huevos fecundados de erizo de mar y la respectiva dilución de DMSO, y control para flavonoides que sólo contendrán 1 mL de agua de mar doblemente filtrada con huevos fecundados de erizo de mar.

Se marcaron los viales con las concentraciones respectivas para cada una de las fracciones. Se deja como control el beaker con los óvulos fecundados a temperatura ambiente y con oxigenador. Los viales con las diferentes concentraciones de extracto y los controles se colocaron en una incubadora



a 15°C sobre una plataforma (agitador mecánico) con oxigenación permanente.

Se realizaron observaciones a las 24 y 48 horas de haberse producido la fecundación:

Luego de 24 horas se observó cada uno de los viales con la ayuda de un microscopio compuesto, visualizándose en que estadio de desarrollo se encontraron los óvulos fecundados. Se retornaron los viales a la incubadora y se repitieron las observaciones a las 48 horas.

### **3.8 Actividad citotóxica en cultivos de líneas celulares (Skehan, P. 1990; Vichai, V. 2006)**

La unidad experimental fue cada célula perteneciente a las líneas celulares 3T3 (fibroblastos normales de embrión de ratón), H-460 (carcinoma de pulmón tipo células no pequeñas, humano), HuTu80 (carcinoma de duodeno, humano), DU145 (carcinoma de próstata, humano), MCF-7 (adenocarcinoma mamario, humano), M-14 (melanoma amelanótico, humano), HT-29 (adenocarcinoma de colon, humano), K562 (leucemia mielógena, humana).

Las muestras corresponden a las fracciones de fisalinas y flavonoides obtenidas según lo descrito en los ítems 3.4 y 3.5. Se utilizaron la fracción 2 y la fracción 3 de fisalinas y la fracción D correspondiente a flavonoides.

Las líneas celulares H-460 y DU-145 fueron cultivadas y mantenidas en crecimiento logarítmico en el medio de cultivo MEM (*minimum essential medium*) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 50 ug/mL de gentamicina; asimismo las líneas celulares MCF-7, M-14, ME-180, HT-29 y K-562 en el medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con 10% de suero bovino fetal y 50 ug/mL de gentamicina. Finalmente la línea celular 3T3 creció en el medio de cultivo DMEM (*Dulbecco modified eagle medium*). Todas las líneas fueron mantenidas a temperatura de 37°C, en ambiente húmedo, con 95 % de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

Para resuspender cada línea celular, se lavó la monocapa de células con 3x4 mL de la solución de Hanks sin Ca-Mg. Luego, se agregó 1 mL de la

solución de tripsina-EDTA, que después de diez segundos fue eliminada. Se incubó el frasco invertido, por ocho minutos a 37°C, al término de los cuales los cultivos fueron resuspendidos en 2 mL de cada medio de cultivo. En el caso de la línea K-562 no se utilizó este método, porque las células crecen en suspensión. Luego, se contó las células usando un hemocitómetro. Cada pozo de una placa de 96 pozos recibió 160 uL de medio, conteniendo el número de células que se especifica en la tabla 4.

**Cuadro 4. Número y concentración de células por pozo**

Línea celular	N° de células / pozo	N° de células /38 mL
H460	1 500	356 250
HuTu80	3 500	831 250
DU145	3 500	831 250
MCF-7	5 000	1 187 500
M-14	5 000	1 187 500
HT-29	3 000	712 500
K562	2 500	593 750
3T3	3 500	831 250

Para el ensayo de citotoxicidad se utilizó una placa 0 (control), asignándose cuatro pozos para cada línea celular y una placa 1 (experimental) con doce pozos para cada línea celular. En cada pozo de ambas placas se colocó 160 uL de medio de cultivo conteniendo las células. Se incubó a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire, por 24 h. A la placa 0 se le añadió ácido tricloroacético (TCA), para fijar las células y cuantificarlas luego, en tiempo cero. A la placa 1 se le agregó las diferentes diluciones de las fracciones y de 5-fluorouracilo, que se muestra en la tabla 5.

**Cuadro 5. Diluciones de las fracciones de fisalinas y flavonoides utilizadas para el ensayo de citotoxicidad en líneas celulares**

Diluciones ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fisalinas	
	Fracción 2	Fracción 3
1	15.6250	15.6250
2	3.9063	3.9063
3	1.9531	1.9531
4	0.9766	0.9766
5	0.4883	0.4883
6	0.2441	0.2441

Diluciones ( $\mu\text{g/mL}$ )	Flavonoides	Control positivo
	Fracción D	5-fluorouracilo
1	250.0000	9.7650
2	62.5000	2.4413
3	15.6250	0.6103
4	3.9063	0.1526

Para las diluciones de las fracciones 2 y 3 de fisalinas, se mezcló 5 mg de cada fracción + 40  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido. El sobrenadante fue el stock de 5mg/40  $\mu\text{L}$  y de este 7,2  $\mu\text{L}$  fueron diluidos en 640 mL de medio; con diluciones sucesivas de 1:4. La concentración inicial que se usó fue 15,625 ug/mL para la fracciones de fisalinas.

Para las diluciones de la fracción D de flavonoides, se mezcló 5 mg de cada fracción + 40  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido. El sobrenadante fue el stock de 5mg/40 mL y de este 12,8  $\mu\text{L}$  fueron diluidos en 640 mL de medio; con diluciones sucesivas de 1:4. La concentración inicial que se usó fue 250,0 ug/mL para la fracción D de flavonoides.

La placa 1 fue incubada por 48 horas adicionales.

Para la evaluación de la actividad antitumoral, se empleó el método del bioensayo de citotoxicidad con sulforodamina B (SRB) descrito por Skehan, P. et al (1990). El ensayo se detuvo añadiendo ácido tricloroacético (TCA) a las placas. Las células que se fijaron con el TCA se tiñeron por 20 minutos

con una solución de SBR al 0,4% en ácido acético al 1%. El SBR no unido a proteínas se removió con un lavado de ácido acético al 1%. Luego de secar las placas, el SBR unido a las proteínas se solubilizó con una solución 10 mM de Tris base (Tris(hydroximetil)aminometano) (pH 10,5) y la absorbancia a 510 nm fue leída en una lectora de microplacas. Para la línea K-562, se utilizó conteo directo, mediante el contador Coulter.

### **3.9 Análisis estadístico de datos**

Para el análisis se elaboró una base de datos en el paquete Microsoft Excel 2013. La concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) se halló mediante el análisis de regresión lineal (ecuación de la recta:  $y=mx+b$ ). Luego, se precisó el índice de selectividad de las fracciones, definido como la relación de citotoxicidad entre células normales y células cancerosas:  $CI_{50}$  (línea celular 3T3) / ( $CI_{50}$  (línea tumoral)), el cual es  $> 1$  cuando la citotoxicidad para las células tumorales supera a la citotoxicidad de las células normales.

## CAPITULO IV: RESULTADOS

### 4.1 Marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas

El estudio taxonómico evidenció que la planta evaluada corresponde a *Physalis peruviana* L. según Constancia N° 221-USM-2012 emitido por el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Anexo 1).

El cuadro 4 indica los resultados obtenidos para la marcha fitoquímica:

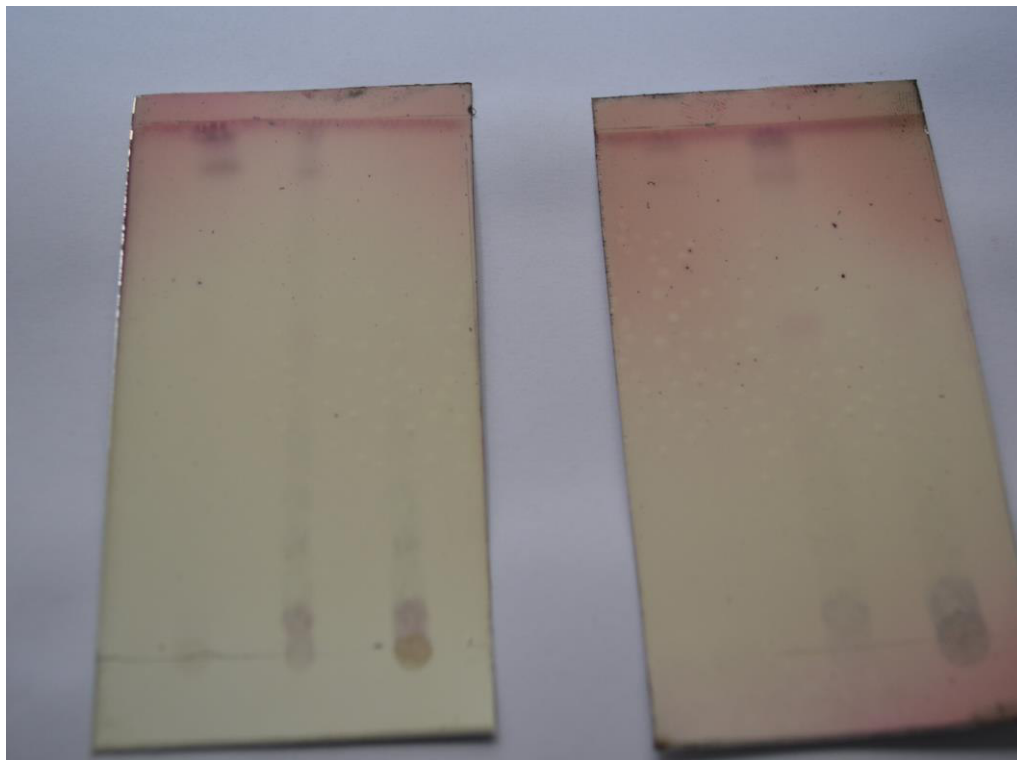
**Cuadro 6. Resultados de la marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de *Physalis peruviana* L**

Metabolito secundario	Ensayo	Resultado
<b>Esteroides</b>	<i>Liebermann-Burchard</i>	+
<b>Flavonoides</b>	<i>Shinoda</i>	+
<b>Taninos</b>	<i>Gelatina</i>	+
<b>Alcaloides</b>	<i>Dragendorff</i>	+

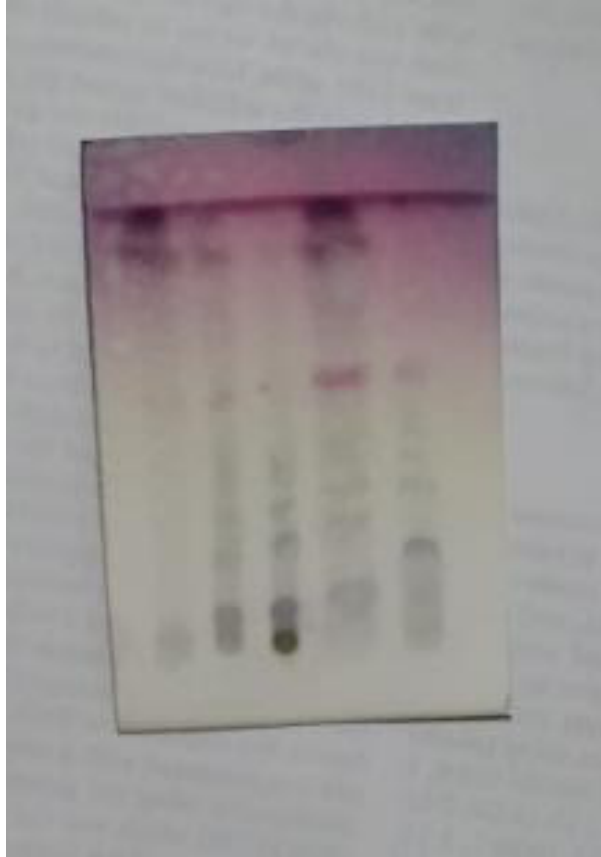
### 4.2 Extracción y aislamiento de las fisalinas

Se obtuvo el extracto etanólico el cual fue lavado con cloroformo, la solución clorofórmica fue evaporada a sequedad obteniéndose el extracto clorofórmico.

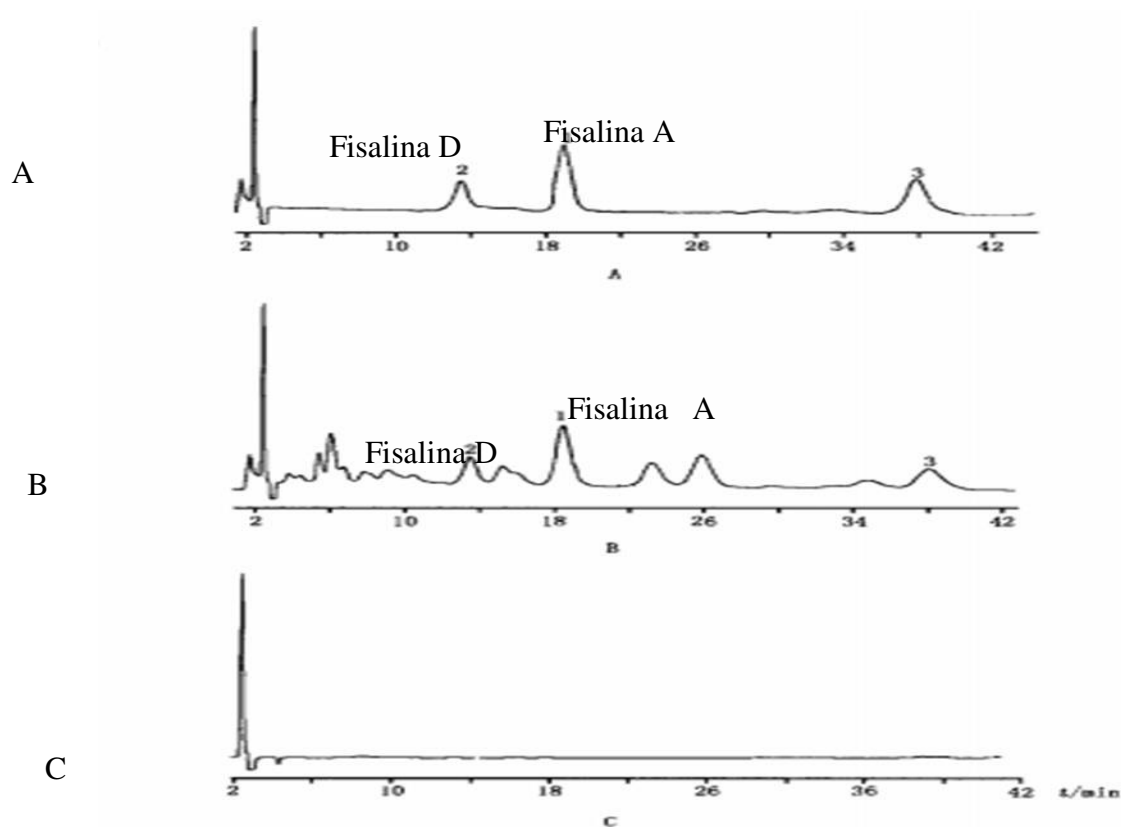
Luego de la filtración secuencial con solventes de mayor a menor polaridad (hexano-diclorometano – acetato de etilo – metanol) y de las siguientes eluciones (hexano – acetato de etilo del extracto diclorometánico) se obtuvieron 6 fracciones las que se analizaron por cromatografía en capa fina (Figura 8 y Figura 9 )



**Figura 8. Cromatograma en capa fina de fisalinas (a)**



**Figura 9. Cromatograma en capa fina de fisalinas (b)**



**Figura 10. Cromatogramas de fisalinas A y D por HPLC**

- A) Cromatograma de estándares
- B) Cromatograma de muestra
- C) Cromatograma de blanco

En la figura 10 se observan los cromatogramas obtenidos en la determinación de los compuestos activos de la especie de *Physalis* (Shi, R., Jia, L., Sun, Q., Yu, D., 2008), que se corresponden con los cromatogramas obtenidos en los anexos 9, 10 y 11.



### 4.3 Extracción y aislamiento de flavonoides

El extracto etanólico de las hojas se utilizó para el aislamiento de los flavonoides mediante cromatografía descendente en papel obteniéndose seis fracciones visibles bajo la luz UV y con vapores de amoníaco + luz UV, el cuadro 4 presenta la relación entre el color de las manchas y la posible estructura del flavonoide.

**Cuadro 7. Relación entre el color de la mancha a la luz UV y la estructura del flavonoide**

	Color de la mancha a la luz UV		Posible tipo de flavonoide
	Sin NH <sub>3</sub>	Con NH <sub>3</sub>	
<b>Fracción A</b>	Púrpura	Naranja	Chalcona con 2- y/o 4-OH
<b>Fracción B</b>	Naranja fluorescente	Sin cambio o pequeño cambio	Flavonoles con un 3-OH libre y con o sin 5-OH libre
<b>Fracción C</b>	Amarillo opaco	Amarillo fosforescente	Flavonoles con un 3-OH libre y con o sin 5-OH libre
<b>Fracción D</b>	Púrpura	Verde parduzco	5-OH flavonas o flavonoles (3-O substituidos) con 4'-OH / 5-OH flavanonas
<b>Fracción E</b>	Celeste fluorescente	Sin cambio o pequeño cambio	Isoflavonas carente de 5-OH libre
<b>Fracción F</b>	Invisible	Fluorescente celeste	Isoflavonas carente de 5-OH libre

Las fracciones fueron resuspendidas en metanol y se realizó la reacción de Shinoda, en el cuadro 6 se indica lo obtenido:

**Cuadro 8. Resultados de la reacción de Shinoda para flavonoides**

	Intensidad del color rojizo
	Reacción de Shinoda
Fracción A	+
Fracción B	+
Fracción C	+
Fracción D	+++
Fracción E	-
Fracción F	-

Las fracciones A, B, C y D se observaron al espectrofotómetro UV obteniéndose los espectros de los anexos 2, 3, 4 y 5 respectivamente.

#### **4.4 Actividad antioxidante mediante el ensayo de DPPH**

La capacidad antioxidante de las fisalinas y de los flavonoides de las hojas de *Physalis peruviana* L fueron estimados y comparados con ácido ascórbico (control positivo) usando el radical estable DPPH. La solución de DPPH en metanol se preparó a una concentración de 0.02 mg/mL y su absorbancia fue medida a 517 nm. El DPPH, un radical libre estable de color púrpura es reducido a difenilpicrilhidrazina coloreado de amarillo cuando los antioxidantes son añadidos. Todas las muestras fueron analizados por triplicado. Los 0.8 mL de las diferentes concentraciones de estandar positivo o de las muestras fueron añadidos y la absorción fue medida después de 20 minutos en un espectrofotómetro.

La capacidad de atrapar radicales DPPH fue calculado por la siguiente ecuación:

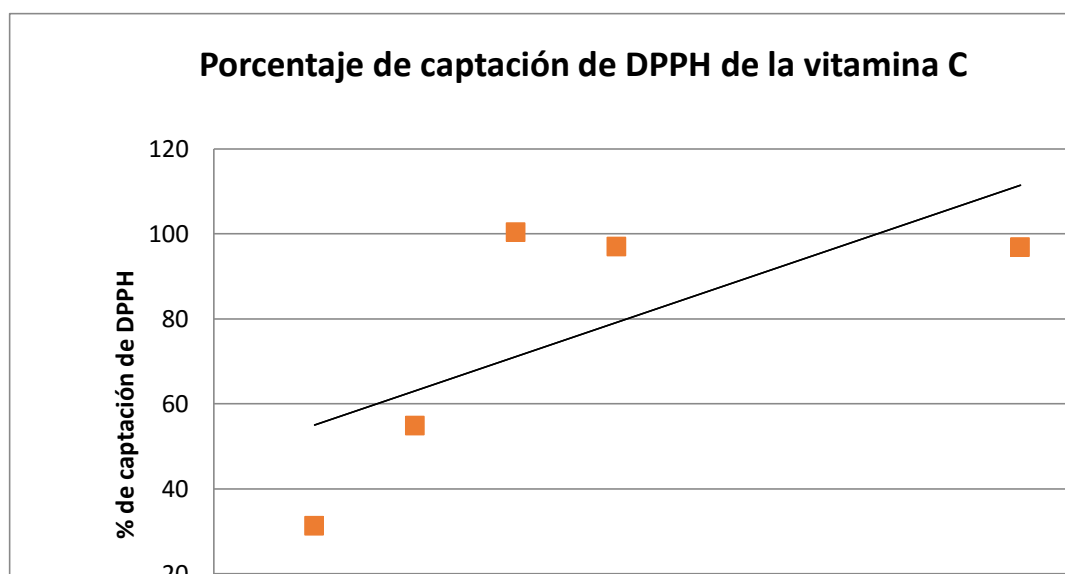
$$\% \text{ Efecto atrapador} = [( \text{Absorbancia solución DPPH} - \text{Absorbancia de la muestra} ) / \text{Absorbancia solución DPPH}] \times 100$$

La solución de DPPH fue usado como blanco. El porcentaje % de efecto atrapador fue analizado contra las concentraciones de las muestras y una curva de regresión logarítmica fue establecida para calcular el valor IC50 (mg/mL) el cual es la concentración de la fracción de fisalinas y de la fracción de flavonoide que inhibe el 50% de DPPH respectivamente.

La fracción 5 de fisalinas demostró baja capacidad para reducir al radical estable DPPH a un compuesto amarillo difenilpicrilhidrazina, en cambio la fracción D de los flavonoide resultó efectivo en atrapar al radical DPPH según resultados de las figuras 11 y 12. El control positivo también demostró incremento de la actividad atrapadora del radical DPPH dosis-dependiente.

**Cuadro 9. Actividad antioxidante del radical DPPH de la Vitamina C**

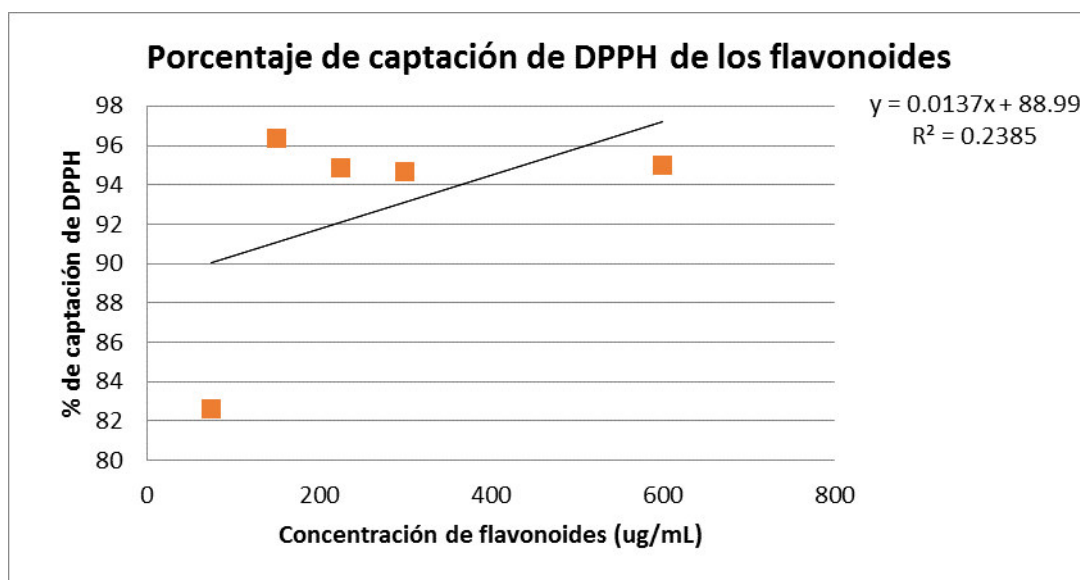
Porcentaje de captación de DPPH de la vitamina C		
Concentración de vitamina C (µg/mL)		% Captación
3		31.21
6		54.83
9		100.26
12		96.90
24		96.77



**Figura 11. Relación % de actividad antioxidante y concentración de la vitamina C**

**Cuadro 10. Actividad atrapadora del radical DPPH de los flavonoides**

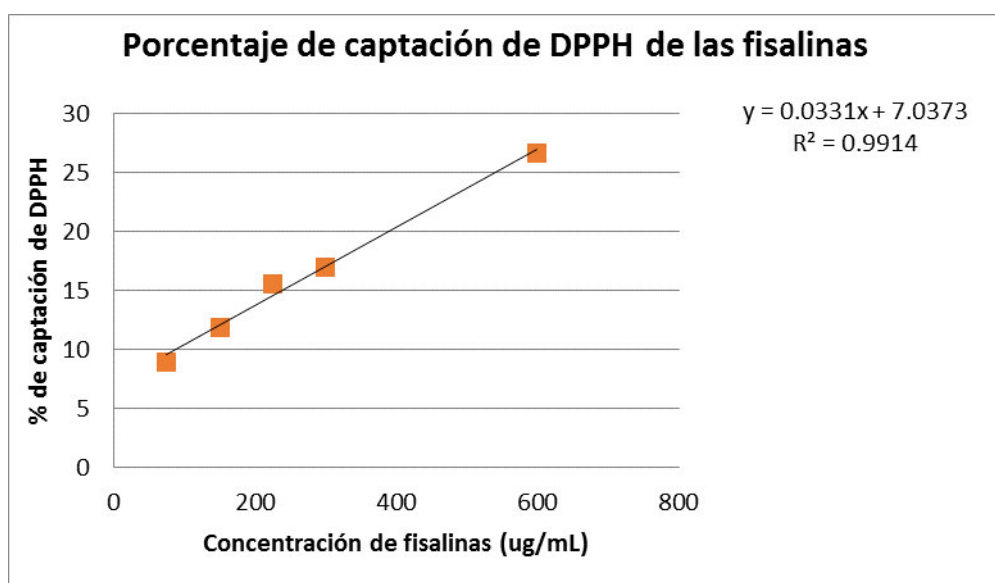
Porcentaje de captación de DPPH de los flavonoides		
Concentración de flavonoides (µg/mL)		% Captación
75		82.59
150		96.38
225		94.83
300		94.66
600		95.00



**Figura 12. Relación % de actividad atrapadora y concentración de los flavonoides**

**Cuadro 11. Actividad atrapadora del radical DPPH de las fisalinas**

Porcentaje de captación de DPPH de las fisalinas		
Concentración de fisalinas (µg/mL)		% Captación
75		8.88
150		11.90
225		15.52
300		16.98
600		26.64

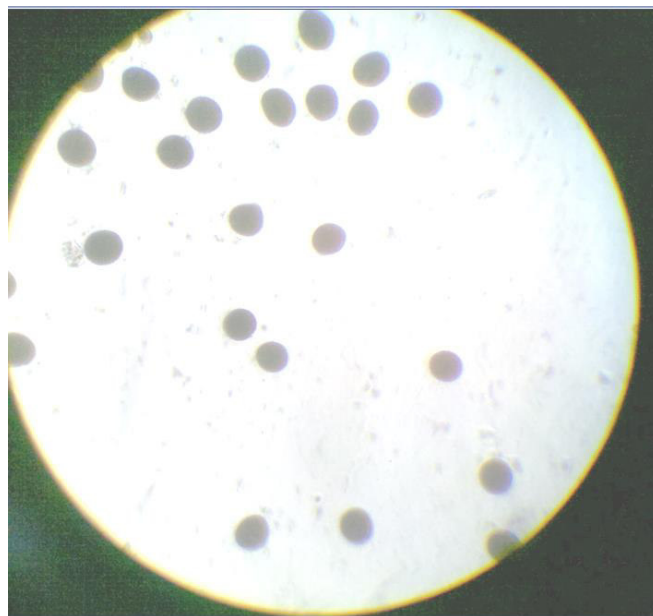


**Figura 13. Actividad atrapadora del radical DPPH de las fisalinas de las hojas de *Physalis peruviana* L**

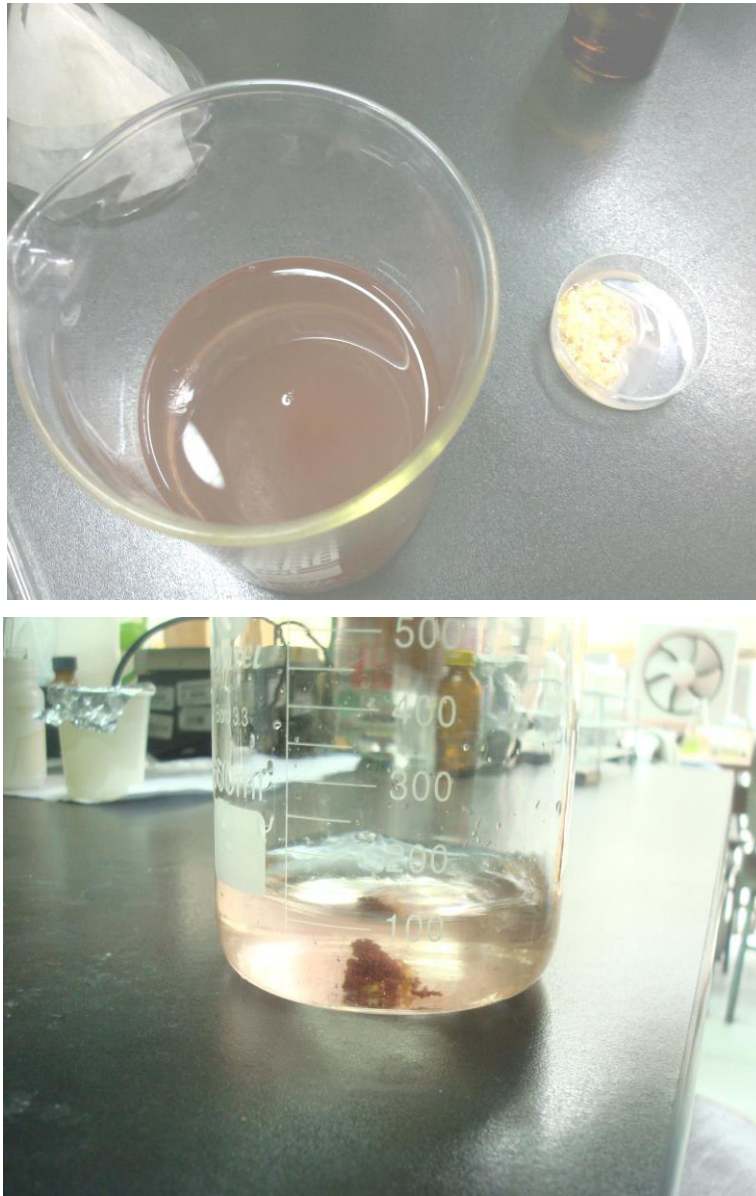
#### **4.5 Actividad citotóxica por bioensayo de citotoxicidad en erizos de mar**

Se realizaron las observaciones a los controles y diluciones de las muestras a las 24 y 48 horas. Se observó cada vial con el estereoscopio comenzando por el control de cada tipo de muestra para establecer un % de células vivas, siendo la condición óptima 100%: la cantidad total de huevos fecundados presentes en 1 mL de agua de mar. Si el % era muy pequeño, significa que no se produjo adecuadamente la fecundación o que algún factor externo estaría afectando. Se debía repetir el ensayo.

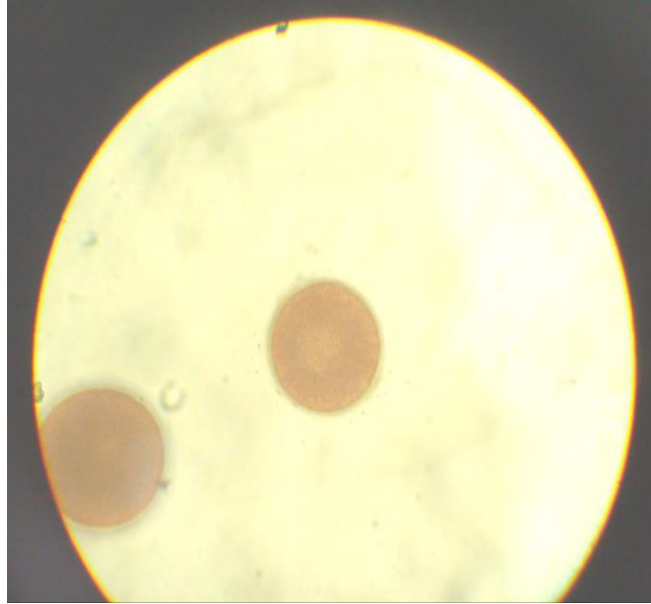
Luego de observar el control se continuó con la observación de las diluciones de las muestras estableciéndose la fase en que se encontraban las células o en qué fase se produjo la muerte (blástula, gástrula, estado de prisma o pluteus) (figuras 14, 15, 16 y 17)



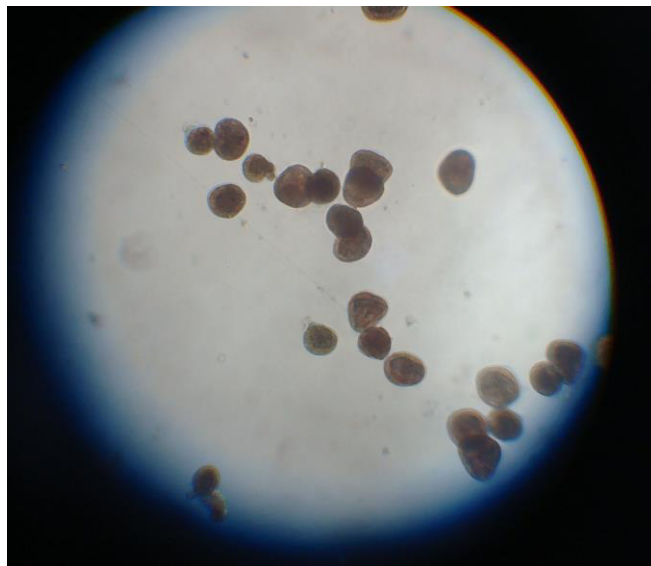
**Figura 14. Óvulos de erizos de mar *Tetrapygus niger***



**Figura 15. Fecundación de gametos de erizos de mar *Tetrapygyus níger***



**Figura 16. Formación de la membrana de fertilización**



**Figura 17. Fase gástrula de embriones de erizos de mar  
*Tetrapygus niger***



En este ensayo los controles y las muestras de menor concentración (5 ppm), alcanzaron el estadio de gástrula en algunos viales.

La concentración de 10 ppm presentó efecto citostático que se evidencia con el menor desarrollo de algunos individuos. La concentración de 30 ppm resultó ser letal para algunos de los huevos fecundados. Posteriormente se decidió hacer un seguimiento de 48 horas.

A las 48 horas se realizó la siguiente observación, los individuos muestreados alcanzan su desarrollo hasta blástula o mueren, por otro lado se evidencia claramente que la concentración que presentó alteración en el desarrollo embrionario del erizo de mar fue de 30 ppm, incluso muchos de ellos murieron.

**Cuadro 12. Actividad citotóxica de las fisalinas de las hojas de *Physalis peruviana* L**

Concentraciones	24 horas	Porcentaje	Observaciones	48 horas	Porcentaje	Observaciones
Control	v	100%	En blástula con movimiento normal, algunos en gástrula	v	100%	En blástula y gástrula
5 ppm - Vial 1	v	100%	Blástula en movimiento, en algunos casos lentos; se observan pocas en gástrula	v/+	20% / 80%	Blástula en movimiento más lento; la mayoría muertos
5 ppm - Vial 2	v	100%		v/+	29% / 71%	
5 ppm - Vial 3	v	100%		v	100%	
10 ppm - Vial 1	v	100%	Blástula en movimiento, en algunos casos lentos y en otros algunos muertos	v/+	27% / 73%	Blástula en movimiento más lento; la mayoría muertos con cierta decoloración
10 ppm - Vial 2	v/+	58% / 42%		v/+	25% / 75%	
10 ppm - Vial 3	v	100%		+	100%	
30 ppm - Vial 1	+	100%	Blástula en movimiento más lento, presencia de más células muertas	+	100%	Todos muertos, no llegaron a gástrula
30 ppm - Vial 2	v/+	40% / 60%		+	100%	
30 ppm - Vial 3	v/+	25% / 75%		+	100%	
v = vivos						
+ = muertos						

**Cuadro 13. Actividad citotóxica de los flavonoides de las hojas de *Physalis peruviana* L**

Concentraciones	24 horas	Porcentaje	Observaciones	48 horas	Porcentaje	Observaciones
Control	v	100%	En blástula con movimiento normal, algunos en gástrula	v	100%	En blástula y gástrula
5 ppm - Vial 1	v	100%	Blástula y gástrula en movimiento, muy pocos lentos	v/+	78% / 22%	Blástula la mayor parte y gástrula en movimiento muy lento, algunas células muertas
5 ppm - Vial 2	v	100%		v	100%	
5 ppm - Vial 3	v	100%		v	100%	
10 ppm - Vial 1	v	100%	Blástula y muy pocos en gástrula en movimiento, un poco lento; presencia de algunas células muertas	+	100%	Movimiento reducido, presencia de células muertas en su mayoría
10 ppm - Vial 2	+	100%		v/+	55% / 45%	
10 ppm - Vial 3	v/+	70% / 30%		v/+	40% / 60%	
30 ppm - Vial 1	v/+	59% / 41%	Blástula en movimiento lento y normal respecto al control; presencia de algunas células muertas	+	100%	Todos muertos, no llegaron a gástrula
30 ppm - Vial 2	v/+	66% / 34%		+	100%	
30 ppm - Vial 3	+	100%		+	100%	
v = vivos						
+ = muertos						

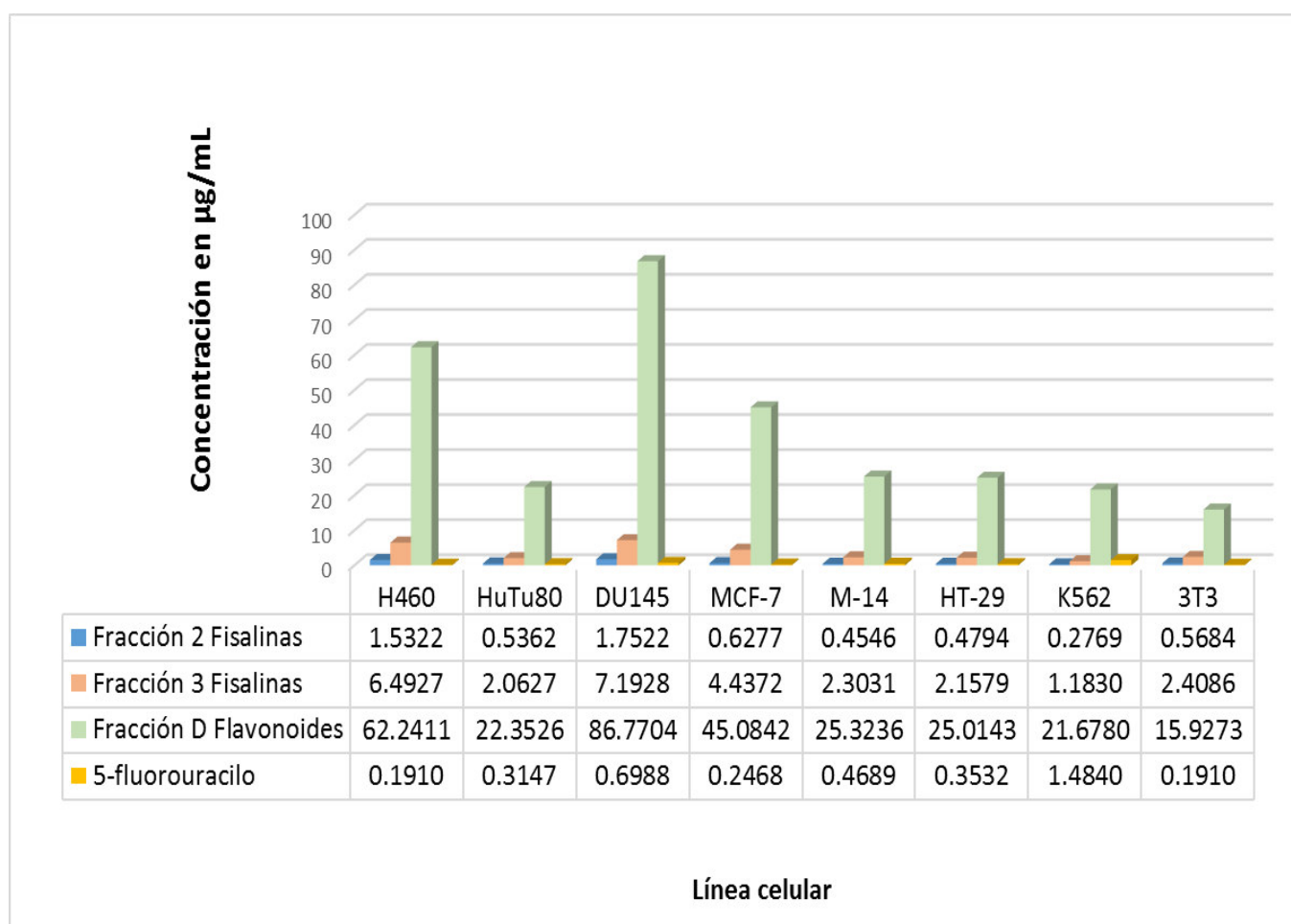
#### **4.6 Actividad citotóxica en cultivos de líneas celulares**

Para las fracciones 2 y 3 de fisalinas y la fracción de flavonoides evaluada el comportamiento de las líneas celulares fue el siguiente. Para la línea H-460 los porcentajes de crecimiento estuvieron entre -1,2 a 106,7, asimismo en la línea celular HuTu80, estuvieron entre -11,3 y 98,4. Para el caso de DU-145 fueron de -6,2 a 104,0. En MCF-7 variaron de -13,3 a 108,0. En la línea celular M14, los valores fueron entre -15,9 a 89,6 y en HT-29 fueron de -0,49 a 100,8. Para la línea celular K-562 los porcentajes de crecimiento se encuentran entre -10,5 a 102,8. Finalmente en la línea celular control 3T3 fueron -33,2 a 96,4. En el control 5-fluorouracilo, el menor porcentaje de crecimiento fue para la línea celular H-460 siendo de 4,4.

Con los porcentajes de crecimiento celular se determinó la  $CI_{50}$ . No existe correlación lineal entre diluciones y porcentaje de crecimiento, debido a esto se tomó los dos puntos correspondientes a las diluciones más cercanas a  $CI_{50}$  para la construcción de una nueva recta que determine un  $CI_{50}$  más próximo.

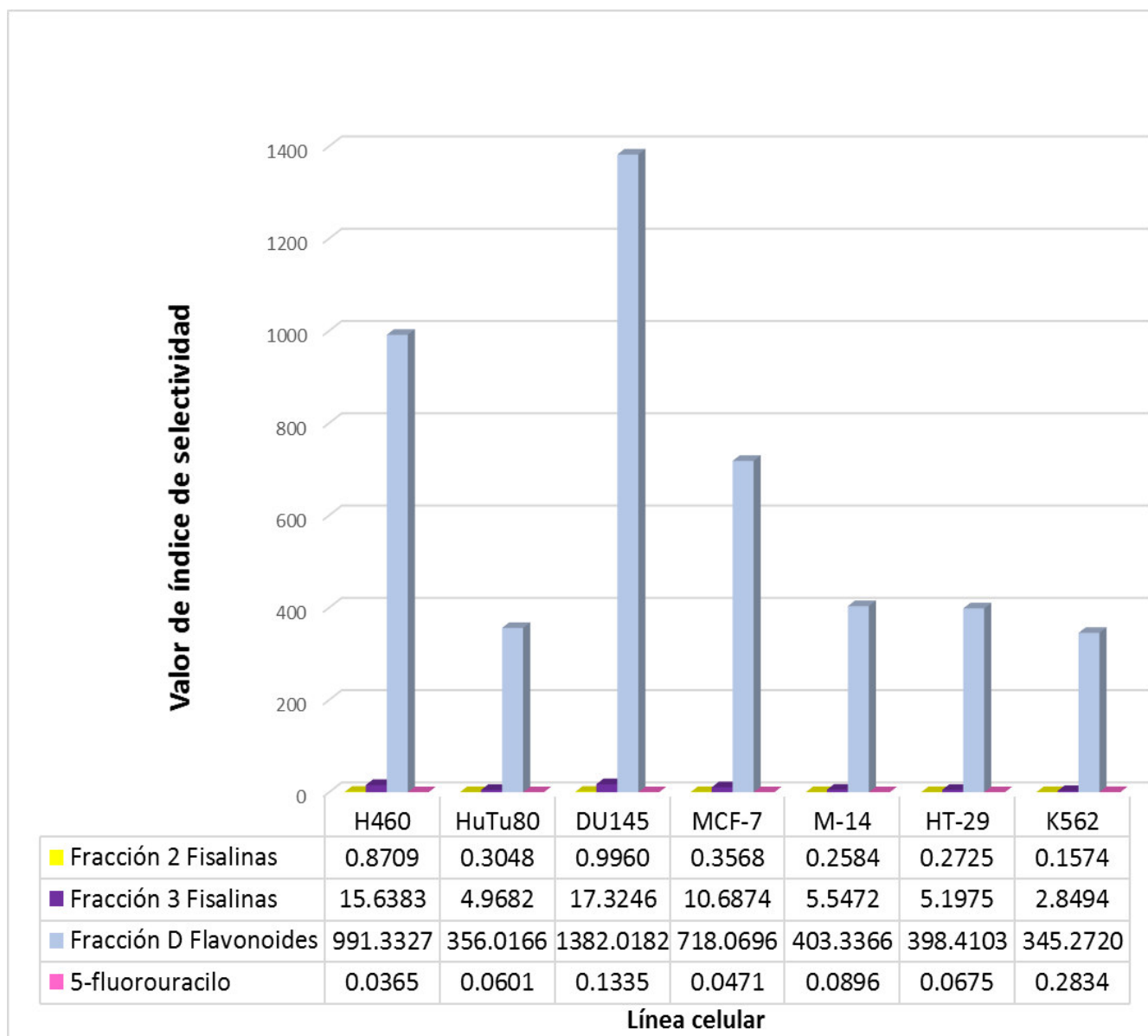
En la figura 18 se observan los valores de  $CI_{50}$  de las fracciones 2 y 3 de fisalinas y flavonoides, así como el control 5-fluorouracilo (5-FU) en las líneas celulares tumorales estudiadas. El comportamiento de los flavonoides mostró  $CI_{50}$  superiores a los reportados para las fisalinas, evidenciando menor citotoxicidad en el presente estudio. Por el contrario la fracción 2 de fisalinas demostró mayor actividad citotóxica, en todas las líneas tumorales. El 5-fluorouracilo presentó la mayor citotoxicidad en casi todas las líneas celulares a excepción de las líneas M-14 y K-562 en las cuales la fracción 2 de fisalinas presentó mayor citotoxicidad.

El valor de  $CI_{50}$  de los flavonoides para la línea celular control 3T3, fue el menor registrado en todas las líneas celulares y no supera a la mayor concentración empleada en el estudio.



**Figura 18. Valores de CI50 de las fracciones de fisalinas y de flavonoides frente a las líneas celulares**

Los índices de selectividad de las fracciones 2 y 3 de fisalinas, la fracción de flavonoides y el control cisplatino se muestran en la figura 19. El índice de selectividad de la fracción 2 de fisalinas y del 5-fluorouracilo para todas las líneas celulares son menores a la unidad (mayor citotoxicidad para células normales). En cuanto a la fracción 3 de fisalinas los índices de selectividad superaron a la unidad (mayor citotoxicidad para células tumorales) y los flavonoides los superó ampliamente en todas las líneas celulares evaluadas. Estos datos demuestran la amplia seguridad de las fracciones por su selectiva citotoxicidad para las líneas celulares tumorales.



**Figura 19. Índices de selectividad de las fracciones de fisalinas y de flavonoides**

## CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

El género *Physalis* es el tercer género en número de especies dentro de las Solanaceae, esto no hace sino abrir el abanico de investigaciones en el futuro. Sus potenciales alimenticio, económico, nutracéutico y ecológico deberían estimular el desarrollo de estudios enfocados a conocer y comprender mejor la riqueza fitoquímica del género, el fundamento bioquímico y fisiológico de sus propiedades medicinales, para desarrollar marcadores moleculares que faciliten la domesticación de especies silvestres y la generación de nuevas variedades de las especies cultivadas (De Cobaleda, M., Reyes, A., Barriada, G., Medina, J., Torres, R., Delgado, E., et al, 2013).

Los antecedentes de investigación previos a este trabajo se encuentran en reportes de actividad antioxidante en extractos de los diversos órganos de *Physalis peruviana* L. y en otras importantes especies del género, utilizando el método de la actividad atrapadora del radical DPPH. En cuanto al estudio de la actividad citotóxica en embriones de erizo de mar se ha encontrado reportes en especies de distinto género a *Physalis peruviana* L. y su aplicabilidad por la buena correlación con los ensayos en células tumorales. Específicamente trabajos de ambas actividades en fisalinas y flavonoides aislados de la especie en estudio no han sido reportados.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antioxidante y la actividad citotóxica de las fisalinas y de los flavonoides presentes en las hojas de *Physalis peruviana* L. obtenidos por fraccionamientos con solventes dirigidos para obtener compuestos que demuestren su actividad.

El fraccionamiento fue dirigido hacia la búsqueda de dos tipos de compuestos: los flavonoides de naturaleza fenólica, intensa absorción en la región ultravioleta y de reconocida actividad antioxidante al reducir el estrés oxidativo en las células y los compuestos tipo witaesteroides,

específicamente las fisalinas, teniendo en cuenta los reportes encontrados en la literatura sobre su presencia en especies del género *Physalis*, conforme a ello este tipo de compuestos son encontrados en fracciones obtenidas con solventes de polaridad media como diclorometano y acetato de etilo. Sin embargo la obtención de las fisalinas encontradas en este estudio no resultó sencilla, pues es necesario modificar los procedimientos de extracción para lograr el aislamiento (Medina, D.P., 2012).

Las actividades de las fisalina obtenidas en este y en trabajos previos sugieren que algunos de los efectos observados en la medicina tradicional con el uso de los extractos de *Physalis peruviana* en el tratamiento de varias enfermedades son en parte debido a la acción de las moléculas tipo seco-esteroides presentes en esta especie (Soares, M.B. 2006).

Las fisalinas son estables a temperatura ambiente (30-33°C), mantenidas en envases ámbar, y son solubles en acetato de etilo y metanol (Soares, M.B., Brustolim, D., Santos, L., Bellintani, M., Paiva, F., Ribeiro, Y., et al., 2006).

Se aplicaron dos métodos para la identificación de fisalinas mediante HPLC por tiempo de retención RT al no contar con estándares de los mismos; de acuerdo a los cromatogramas de la figura 10 y a los del anexo se encontró que la fracción 5 de fisalinas no presenta picos a los tiempos indicados, por el contrario las fracciones 2, 3 e inclusive 6 muestran picos y en cantidades detectables. Las manchas rojizas de las otras fracciones 1, 4 y 5 pueden deberse a otros compuestos que se identifican con el reactivo revelador utilizado ya que éste no es exclusivo de fisalinas pero identifica terpenoides, derivados de fenilpropano, fenoles, etc.

DPPH es un radical libre estable y acepta un electron o radical hidrógeno para llegar a ser una molécula diamagnética estable el cual es ampliamente usado en la investigación de actividad atrapadora de radicales. En el ensayo de atrapamiento del radical DPPH, los antioxidantes reaccionan con el DPPH (color violeta oscuro) y lo convierte en alfa,alfa-difenil-beta-picril hidrazina. El grado de decoloración indica el potencial atrapador de radical



del antioxidante. La actividad atrapadora de radical DPPH de la fracción de fisalinas fue reducida pero se observó que se incrementa al incrementar la concentración, indicaría que se requiere mayor proporción de esta fracción para observar el efecto comparable al control positivo.

La fracción de flavonoides exhibió más alta actividad atrapadora comparado al control, pero los resultados demuestran que las concentraciones de trabajo resultaron elevadas. A las mismas concentraciones se observa mayor actividad para los flavonoides; a 600 µg/mL se tiene 26,6% y 97,7% de actividad para las fisalinas y los flavonoides respectivamente.

Existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres. Otros autores se refieren además a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa, la ciclooxigenasa, la mieloperoxidasa, la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa; evitando la generación de especies reactivas del oxígeno *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos. Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2, al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes: catalasa y superóxido dismutasa. De esta forma los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de radicales libres y en la formación del radical en sí (Pérez, G. 2003). Los flavonoides cumplen con los criterios químicos-estructurales que establecen su capacidad antioxidante (Martínez-Flores, S. 2002).

La prueba de citotoxicidad y antimitosicidad en huevos fertilizados de erizos marinos ha sido utilizado comúnmente por biólogos y bioquímicos tanto en estudios sencillos de división celular como en aquellos que incluyen un fuerte componente molecular. Aunque son variados los tipos de células que pueden ser usados para comprobar la susceptibilidad *in vitro* frente a sustancias de interés, los gametos de erizos de mar pueden ser analizados con mayor frecuencia por cuanto no requieren de técnicas sofisticadas de obtención, mantenimiento y observación y son lo suficientemente sensibles

para identificar actividad positiva o negativa con claridad, igualmente para distinguir los efectos antimitóticos de los efectos tóxicos que pudiera presentar un compuesto. Una vez fertilizados los huevos, los embriones sufren divisiones sincrónicas en los primeros clivajes, permitiendo un inusual grado de uniformidad célula a célula cuando se investiga procesos tales como: mitosis, clivaje o eventos bioquímicos que ocurren durante la replicación celular. También es un ensayo adecuado para el estudio de la acción de fármacos, ya que los embriones son expuestos a estas durante los mismos estados del ciclo celular, lográndose de esta forma, un alto grado de reproducibilidad así como de uniformidad (Jacobs, R.S., White, S., Wilson, L., 1981; Mora-Cristancho, J., Zea, S., Santos-Acevedo, M., Newmark-Umbreit, F., 2007).

Al determinar la actividad citotóxica de las fracciones de flavonoides y de fisalinas en huevos fecundados de erizo de mar *Tetrapygus niger*, se ha evidenciado la actividad citostática a las concentraciones trabajadas al encontrarse retraso en los estadios de desarrollo. No se pudo observar ningún tipo de malformación o alteración estructural de los erizos en desarrollo, pero es claro que puede resultar ser tóxico en mayores concentraciones, a determinadas concentraciones el efecto es citotóxico. Esta acción debe estar relacionada con la inhibición de la síntesis de DNA, al detener el ciclo celular.

En la fracción de fisalinas evaluada, el uso de los diferentes solventes no parece ejercer algún tipo de efecto perjudicial frente a los animales de experimentación, puesto que fue sometido a evaporación, dejando sólo la fracción seca que estaba disuelta en ella. De igual manera el disolvente para sustancias medianamente apolares, como las fisalinas, el dimetilsulfóxido o DMSO, no tuvo efecto en la especie de experimentación, puesto que los controles que contenían la misma sustancia no mostraron mayor efecto en los ensayos.

El método utilizado para el estudio de la actividad citotóxica y embriotóxica en ovocitos de erizo de mar es ampliamente aceptado y utilizado en

numerosos estudios de investigación preclínica, debido a su simplicidad y a su confiabilidad (Castañeda, B. 2003; Estus, S. 1989; Graillet, C. 1997; Retuerto, F. 1996)

En la evaluación del efecto citotóxico sobre los embriones de erizos de mar se encontró retardo en el desarrollo embrionario, bloqueando el pase del embrión de la fase blástula a gástrula. Este mismo efecto ha ido observado por diferentes autores (Castañeda, B. 2003; Graillet, C. 1997; Retuerto, F. 1996), con el estudio de fármacos antineoplásicos, retardando la primera división de la blástula a gástrula. Es importante mencionar que no se observó anomalías en los embriones, siendo estas, incluso, menores que en el grupo control, lo que indicaría que tanto las fisalinas como los flavonoides poseen efecto embriotóxico pero no teratogénico. La mortalidad de los embriones fue estadísticamente mayor en relación al grupo control, evidencia del efecto embriotóxico (Retuerto, F. 1996). Este efecto posiblemente se encuentre relacionado con los mecanismos de la apoptosis celular.

Los estudios de citotoxicidad, mutagenicidad y embriotoxicidad forman parte de la estrategia del estudio de la actividad antitumoral de una serie de plantas medicinales peruanas aprovechando su conocimiento etnofarmacológico.

Se evaluó la actividad citotóxica de los flavonoides y de las fisalinas de las hojas de *Physalis peruviana* L, utilizando el método de evaluación de citotoxicidad de la sulforodamina B (Skehan, P., 1990), sobre diferentes líneas celulares tumorales, así como en una línea control normal. Se utilizó el antineoplásico 5-fluorouracilo como control positivo.

Los productos naturales, como fuente de agentes quimioterápicos, han sido alternativa hasta hoy alentadora; tal es el caso de la vinblastina y paclitaxel, que se derivan de la *Cathatanthus roseus* y *Taxus brevifolia*, respectivamente (Zavala, D., Quispe, A., Posso, M., Rojas, J., Vaisberg, A., 2006). Durante las últimas décadas, el enfoque sobre la inducción de

apoptosis de nuevas sustancias ha tomado gran interés, muchos autores han demostrado esta propiedad en muchas plantas (Liu, J., Shen, H., Ong, C. 2000; Lin, Y., Chiang, H., Kan, W. Hone, E., Shih, S. 1992).

Las fracciones de las hojas de *Physalis peruviana* utilizadas mostraron actividad citotóxica frente a las líneas celulares dentro de las concentraciones trabajadas. Nuestros resultados muestran que el 5-fluorouracilo fue muy citotóxico para todas las líneas celulares incluyendo la línea celular control 3T3, que evidencia la posible relación estrecha con sus efectos adversos en los seres humanos.

El presente estudio demostró que las fracciones de fisalinas obtenidas de las hojas de *Physalis peruviana* tienen la capacidad de inhibir el porcentaje de crecimiento celular tumoral, sugiriendo la presencia de compuestos bioactivos, posiblemente como los encontrados por Chiang y col que, al fraccionar el extracto etanólico de *Physalis angulata*, aislaron fisalinas con actividad citotóxica *in vitro* (Chiang, H., Jaw, S., Chen, C., Kan, W. 1992).

El perfil citotóxico más alentador lo muestra la fracción 3 de fisalinas al tener valores de  $CI_{50}$  bajos, pero mayores que la fracción 2; además al presentar valores del índice de selectividad  $> 1$  le provee un mayor margen de seguridad especialmente en la línea DU-145.

Las fisalinas mostraron mayor actividad citotóxica sobre la línea celular K-562. Los flavonoides mostraron baja actividad citotóxica en este ensayo, fueron menos citotóxicos que el 5-fluorouracilo y las fisalinas en la línea celular 3T3.

La fracción de flavonoides no demostró mayor citotoxicidad sobre las líneas celulares evaluadas debido a que presentaron valores de  $CI_{50}$  mayores que las demás fracciones, se refleja en los valores de índice de selectividad que han superado ampliamente el valor de 1.

En relación a la leucemia mieloide crónica, Magalhaes y Col, también evaluaron la citotoxicidad de las fisalinas B y D de *Physalis angulata*, sobre la línea celular K-562, obteniendo  $CI_{50}$  de 4,7 y 0,75  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. En otro estudio Gao y Col., evaluaron la actividad antiproliferativa del extracto etanólico de *Goldfussia psilostachys* en la línea K-562, encontrando un  $CI_{50}$  de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . En este estudio el 5-fluorouracilo mostró  $CI_{50}$  de 1,48  $\mu\text{g/mL}$  y las fracciones 2 y 3 de fisalinas mostraron un  $CI_{50}$  de 0,27  $\mu\text{g/mL}$  y 1,18  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

El  $CI_{50}$  de la fracción 2 de fisalinas fue menor para las líneas celulares M-14 y K-562 en relación al 5-fluorouracilo, el  $CI_{50}$  de la fracción 3 de fisalinas también lo fue en la línea K-562, que indica que la citotoxicidad de estos compuestos es menor en células normales con relación a los controles empleados en el bioensayo.

La inducción de la apoptosis es conocida por ser una estrategia eficiente en la terapia del cáncer. Un estudio sobre la línea celular Hep G2, ha sugerido que el extracto etanólico de *Physalis peruviana* L., inhibe la proliferación celular a través de la regulación positiva de proteínas pro-apoptóticas (Bax y Bad), y la regulación negativa de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl), así como la proteína inhibidora de apoptosis XIAP, que indicaría que la inducción de la apoptosis mediada por los extractos etanólicos de *Physalis peruviana* L. sería a través del sistema CD95/CD95L y la vía de transducción de señales mitocondrial (Wu, S.J. 2004).

Los agentes antineoplásicos son conocidos por inducir citotoxicidad en células tumorales, a través de diversos mecanismos, en los que los eventos de señalización juegan un rol importante dependiendo del tipo celular y del estímulo. Se necesita encontrar nuevos agentes anticancerígenos que puedan destruir células cancerosas con toxicidad mínima para células normales.

## CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las hojas de *Physalis peruviana* ha demostrado presencia de flavonoides y fisalinas.

La extracción, aislamiento y caracterización de las fisalinas presentes en el extracto de las hojas de *Physalis peruviana* L. determinó la presencia de: fisalina B y fisalina D.

La extracción, aislamiento y caracterización de las flavonoides presentes en el extracto de las hojas de *Physalis peruviana* L. determinó la presencia de compuestos tipo flavonas y flavonoles-3-OH-substituídos y/o 3-OH libre.

La fracción evaluada de fisalinas de las hojas de *Physalis peruviana* presenta reducida actividad antioxidante en el ensayo con el radical DPPH con respecto al control positivo y a las concentraciones trabajadas: 26,6% de actividad a la concentración de 600µg/mL, siendo mayor dicha actividad para los flavonoides: 97,7% a la misma concentración.

Las fracciones evaluadas de fisalinas y flavonoides de hojas de *Physalis peruviana* L. presentaron actividad citotóxica a partir de la concentración de 10 ppm en el ensayo con ovocitos de erizo de mar, resultando esta actividad más pronunciada para la fracción de fisalinas. En el ensayo sobre líneas celulares *in vitro* la fracción 2 de fisalinas demostró mayor actividad citotóxica que la fracción 3, teniendo esta última un mayor margen de seguridad que el 5-fluorouracilo. La fracción de flavonoides evaluada en este trabajo presentó baja actividad citotóxica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmad, S., Malik, A., Yasmin, R., Ullah, N., Gul, W., Khan, P., et al. (1999). Withanolides from *Physalis peruviana*. *Phytochemistry*, 50:647-51.
2. Ahmad, S., Malik, A., Yasmin, R., Ullah, N., Gul, W., Khan, P.M., et al. (1999). Withanolides from *Physalis peruviana*. *Phytochemistry*, 50:647-51.
3. Basey, K., McGaw, B.A., Wolley, J.G. (1992). Figrina, un alcaloide de *Physalis* species. *Phytochemistry*, 31:4173-6.
4. Baumann, T.W., Meier, C.M. (1993). Chemical defence by withanolides during fruit development in *Physalis peruviana*. *Phytochemistry*, 33:317-21.
5. Castañeda, B. (2003). Evaluación fitoquímica, toxicológica, analgésica y antiinflamatoria del extracto metabólico de *Alchornea castaneifolia* “Hiporuro”, en animals de laboratorio. *Cultur – 17*, año XXI, NQ 17: 13-21.
6. Castro, A., Juárez, J., Ramos, N., Suárez, S., Retuerto, F., Gonzales, S. (2011). Elucidación estructural del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. ruda, actividad antioxidante y bioensayo de citotoxicidad. *Ciencia e Investigación*; 14(1):25-28. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.
7. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Durango (2013). Una mirada general al tomate de cáscara (*Physalis*). *Vidsupra*, 5(2):90-9.
8. Chiang, H., Jaw, S., Chen, C., Kan, W. (1992). Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. *Anticancer Res.* 12(3):837-43.
9. Damu, A.G., et al. (2007). Isolation, Structures., and Structure–Cytotoxic Activity Relationships of Withanolides and Physalins from *Physalis angulata*. *Journal of Natural Products*, 70:1146-52
10. De Cobaleda, M., Reyes, A., Barriada, G., Medina, J., Torres, R., Delgado, E., et al. (2013). Una mirada general al tomate de cáscara (physalis). *Vidsupra*, 5(2); 90-99.
11. De Puente, L.A., Pinto-Muñoz, C.A., Castro, E.S., Cortés, M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit. A review. *Food Research International*, 44:1733-40.

12. Dinan, L.N., Sarker, S.D., Sik, V. (1997). 28-hydroxiwitanólido E from *Physalis peruviana*. *Phytochemistry*, 44:509-12.
13. Douglas, A. (2011). Características agronómicas de fisalis (*Physalis pubescens* L.) produzida por diferentes métodos e substratos e aspectos anatómicos e fitoquímicos. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Pato Branco.
14. Eliger, C., Eash, J., Waiss, Jr. (1992). Kampferol and quercetin di and triglycosides from *Physalis peruviana* leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*, 20:268-9.
15. Estus, S., Blumer, J. (1989). Critical period of phenytoin teratogenic action in the sea urchin, *Arbacia punctulata* embryo. *J Pharmacol Exp*; 251(2): 782-9.
16. Ferreira, H.I. (2005). Atividade antitumoral (in vitro e in vivo) das fisalinas isoladas de *Physalis angulata* Lin. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza.
17. Fischer, G., Amanza, P. (1993). Nuevas Tecnologías en el cultivo de la uchuva, *Physalis peruviana* L. *Revista Agrodesarrollo*, 4:294-5.
18. Flórez, V., Fischer, G., Sora, A. (2000). Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Unibiblos.
19. Gao, X., Zhang, G., Zhou, M., Luo, D. (2004). Antiproliferative activity of *Goldfussia psilostachys* ethanolic extract on K-562 leukemia cells. *Fitoterapia*. 75(7-8):639-644.
20. Graillet, C., Pagano, G., Girand, J. (1997). Stage-specific effects of teratogens on sea urchin embryogenesis. *Development*; 124(6): 1099-107.
21. Ismail, N., Alam, M. (2001). A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. *Fitoterapia*, 72:676-9.
22. Ismail, N., Alam, M. (2001). A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. *Fitoterapia*, 6:676-9.
23. Jacobs, R.S., White, S., Wilson, L. (1981). Selective compound derived from marine organisms: effects on cell division in fertilized sea urchin eggs. *Fed. Proc.* 40:28-31.



24. Liu, J., Shen, H., Ong, C. (2000). *Salvia Miltiorrhiza* inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cell. *Cancer Lett.* 153:85-93.
25. Lin, Y., Chiang, H., Kan, W. Hone, E., Shih, S. (1992). Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulate*. *Amer J Chin Med.* 20:233-43.
26. Magalhães, H.I., Veras, M.L., Torres, M.R., Alves, A.P., Pessoa, A.D., Silveira, E.R., et al. (2006). In vitro and in vivo antitumour activity of Physalins B and D from *Physalis angulata*. *J Pharm Pharmacol*, 58:235-41.
27. Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J., Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* XVII(6) 271-278.
28. Medina, D.P. (2012). Implementación de una metodología para la obtención de marcadores de frutos de *Physalis peruviana* L., y evaluación de la actividad hipoglicemiante. Universidad Nacional de Colombia.
29. Moon, Y., Morris, M. (2006). Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in vitro*, 20:187-210.
30. Nagai, A. (2012). Efeito induzido pelo vírus Y da batata (*Potato virus Y*) no metabolism secundário do camapu (*Physalis angulata* L.). Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
31. Mora-Cristancho, J., Zea, S., Santos-Acevedo, M., Newmark-Umbreit, F. (2007). Capacidad antimitótica de extractos de esponjas marinas del Caribe colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 36:167- 179.
32. Perea, D., Rodríguez, N., Fischer, G., Velásquez, Y. (2010). Biotecnología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutas tropicales. Universidad Nacional de Colombia.
33. Perez-Castorera, A.L., et al. (2004). Physalins from *Physalis solanaceus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32:1231-4.
34. Pérez, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed.* 22(1): 48-57.
35. Pietta, P. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63:1035-42.

36. Qiu, L., et al. (2008). Steroids and flavonoids from *Physalis alkekengi* var. *franchetii* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Journal Natural Products*, 71:642-46.
37. Qiu, L., Zhao, F., Jiang, Z., Chen, L., Zhao, Q., Liu, H., et al. (2008) Steroids and flavonoids from *Physalis alkekengi* var. *franchetti* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *J Nat Prod*, 71:642-6.
38. Quispe-Mauricio, A., Callacondo, D., Rojas, J., Zavala, D., Posso, M., Vaisberg, A. (2009). Actividad citotóxica de *Physalis peruviana* (Aguaymanto) en cultivos celulares de Adenocarcinoma Colorectal, Próstata y Leucemia mieloide crónica. *Rev. Gastroenterol.*, 29-3:239-46.
39. Retuerto, F., De los Santos, M., Barreto, T., Lezama, M. (1996). Efectos citostáticos del extracto etanólico de *Lepidium mellen* W en células meristemáticas de *Allium cepa*. Laboratorio de Biología Celular. Facultad de Ciencias Biológicas. Instituto de Química Orgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM.
40. Rockenbach, I., Rodrigues, E., Cataneo, C., Gonzaga, L., Lima, A., Mancini-Filho, J. (2008). Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. *Alimentos e Nutricao*, 19:271-6.
41. Ruiz, S., Venegas, E., Chávez, M., Eustaquio, C. (2010). Investigación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. “noni” y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. *UCV – Scientia*, 2(2):11-22.
42. Serr, N. (1998). Flavonoids from *Physalis minima*. *Phytochemistry*, 27:3708-9.
43. Setiawan, D., Sumpena, Y. (2008). Identification of physalin from *Cecendet* (*Physalis angulata* L.) after gamma ray irradiation by using reverse phase high performance liquid chromatography. *Jurnal Bionatura*, 10(3):220-35.
44. Shi, R., Jia, L., Sun, Q., Yu, D. (2008). RP-HPLC determination of there active components in *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast) Makino. *Chin J Pharm Anal*, 28(2):260-2.

45. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, et al. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82: 1107-1112.
46. Soares, M.B., Brustolim, D., Santos, L., Bellintani, M., Paiva, F., Ribeiro, Y., et al. (2006). Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. *International Immunopharmacology*, 6:408-14.
47. Su, B.N., et al. (2002). Isolation and characterization of bioactive principles of the leaves and stems of *Physalis philadelphica*. *Tetrahedron*, 58:3453-66
48. Tomassini, T.C.B., et al. (2000). Gênero *Physalis* – Uma revisão sobre vitaesteróides. *Química Nova*, 23:47-57.
49. Tomassini, T.C.B., et al. (2002) US Patent App & Trademark Office. Process for isolating physalins from plants and pharmaceutical compositions containing physalins. United States patent 20020103386.
50. Vichai, V., Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, vol. 1 N° 3. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.
51. Veras, M.L., et al. (2004). Cytotoxic Withaphysalins from the leaves of *Acnistus arborescens*. *Journal Natural Products*, 67:710-3.
52. Won, S.J., Chiang, H.C., Kan, W.S., Lin, M.T. (1998). Augmentation of mouse splenic NK cytotoxic activity by extracts of *Physalis angulata* L. *J Biomed Lab Sci.*, 1:83-97.
53. Wu, S.J., Chang, S.P., Lin, D.L., Wang, S.S., Hou, F.F., Ng, L.T. (2009). Supercritical carbon dioxide extract of *Physalis peruviana* induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer H661 cells. *Food Chem. Toxicol*, 47;1132-8.
54. Wu, S.J., Ng, L.T., Chen, C.H., Lin, D.L., Wang, S.S., Lin, C.C. (2004). Antihepatoma activity of *Physalis peruviana* and *P. Peruviana* extract and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. *Life Sci*, 74:2061-73.
55. Wu, S.J., Ng, L.T., Lin, D.L., Huang, S.N., Wang, S.S., Lin, C.C. (2004). *Physalis peruviana* extract induced apoptosis in human Hep G2 cell through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway, 215:199-208.

56. Zavala, D., Quispe, A., Posso, M., Rojas, J., Vaisberg, A. (2006). Efecto citotóxico de *Physalis peruviana* (capulí) en cáncer de colon y leucemia mieloide crónica. An fac Med, 67: 283-89.

## **ANEXOS**

## Anexo 1

### Constancia N° 221-USM-2012-Museo de Historia Natural



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



**"Año de la Integración Nacional y el Reconocimiento de Nuestra Diversidad"**

#### CONSTANCIA N°. 221-USM-2012

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Planta completa), recibida de **María Martha HERNÁNDEZ PEVES**, de la Maestría en Recursos Vegetales y Terapéuticos de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Physalis peruviana L.*** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUB CLASE: ASTERIDAE**

**ORDEN: SOLANALES**

**FAMILIA: SOLANACEAE**

**GENERO: *Physalis***

**ESPECIE: *Physalis peruviana L.***

Nombre vulgar: "Capulí".

Determinado por: Mag. María Isabel La Torre.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

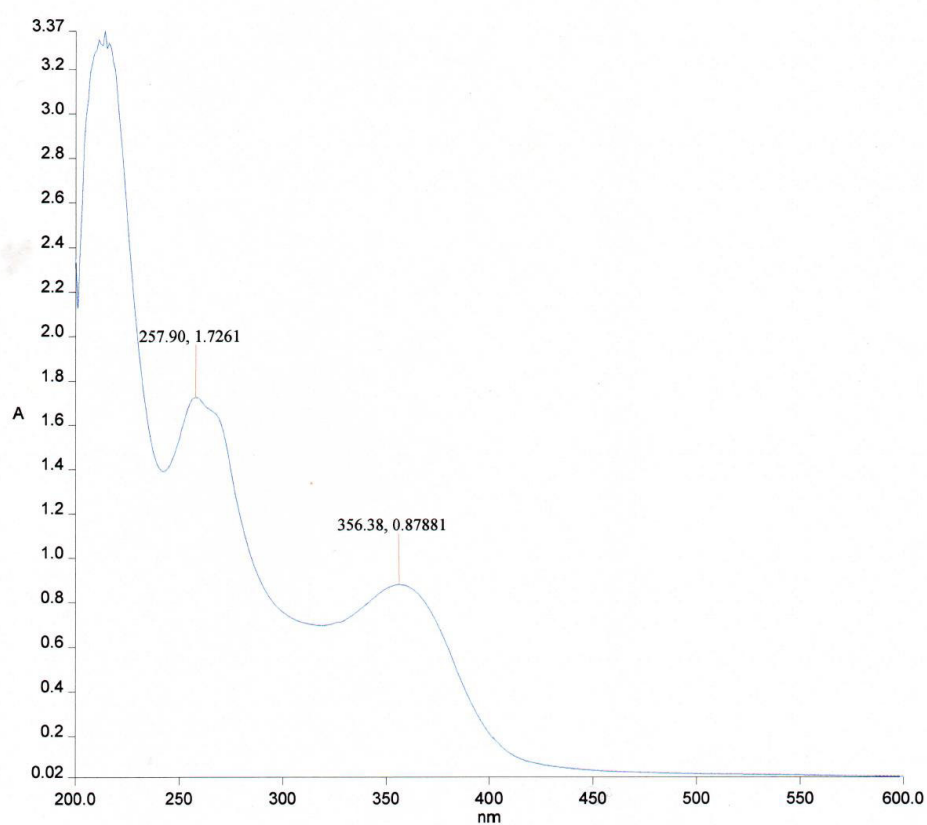
Fecha, 07 de septiembre de 2012



*Haydee Montoya Terreros*  
**Dra. HAYDEE MONTOYA TERREROS**  
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

## Anexo 2

### Espectro UV de la fracción A de flavonoides



#### Description: Fracción A

Spectrum Name: C:\UVWINLAB\DATA\FRAC1.SP

Scan Speed: 240.00 nm/min

Date Created: Thu Nov 20 13:46:08 2014

Slit Width: 1.0000 nm

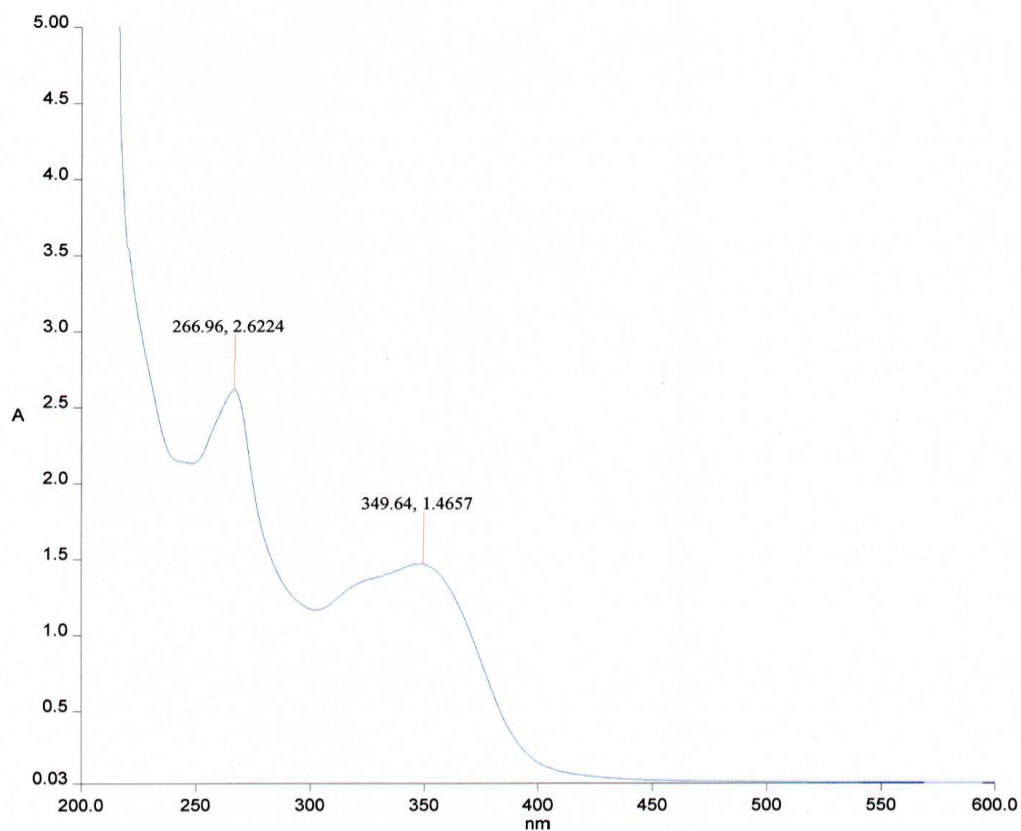
Instrument Model: Lambda 25

Smooth Bandwidth: 0.00 nm

Data Interval: 1.0000 nm

### Anexo 3

#### Espectro UV de la fracción B de flavonoides



#### Description: Fracción B

Spectrum Name: C:\UVWINLAB\DATA\FRAC2.SP

Scan Speed: 240.00 nm/min

Date Created: Thu Nov 20 13:48:50 2014

Slit Width: 1.0000 nm

Instrument Model: Lambda 25

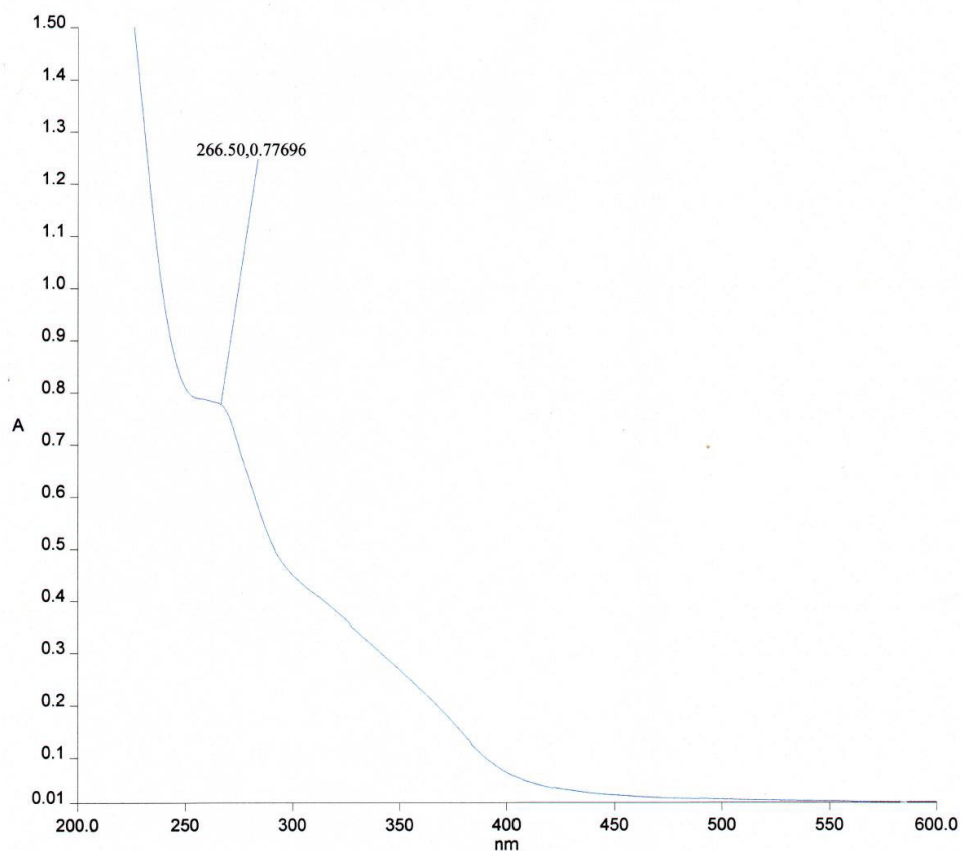
Smooth Bandwidth: 0.00 nm

Data Interval: 1.0000 nm



## **Anexo 4**

### **Espectro UV de la fracción C de flavonoides**



#### **Description: Fracción C**

Spectrum Name: FRAC3.SP

Scan Speed: 120.00 nm/min

Date Created: Fri Nov 21 15:32:40 2014

Slit Width: 1.0000 nm

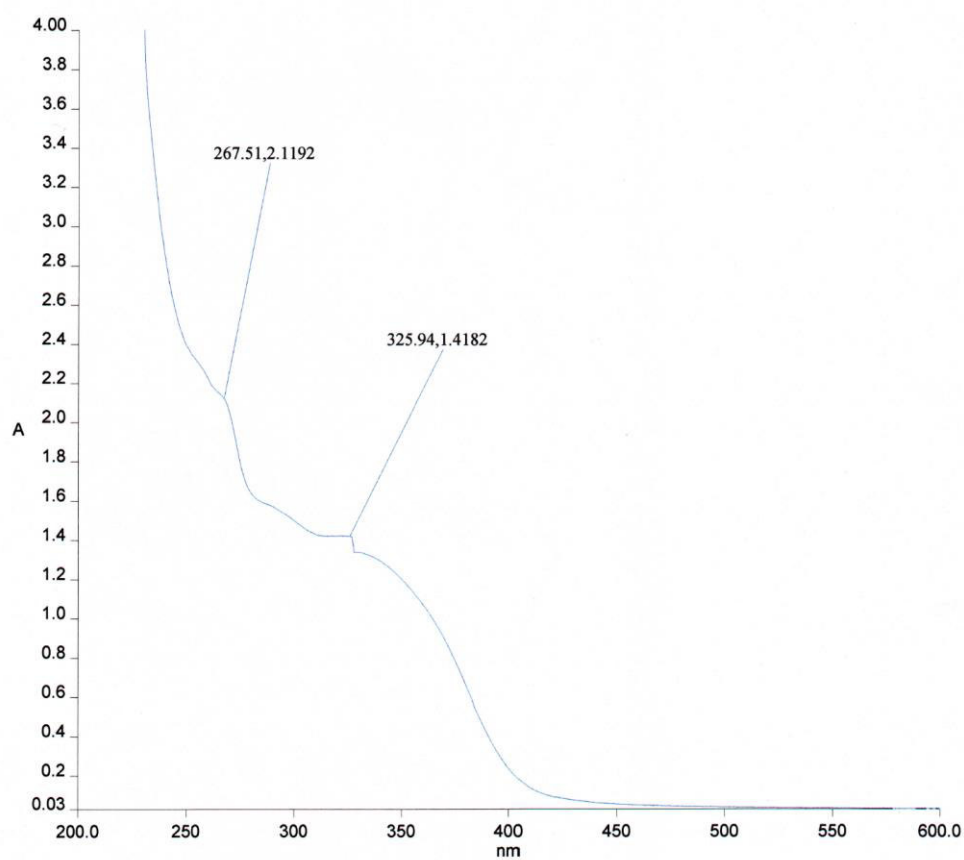
Instrument Model: Lambda 25

Smooth Bandwidth: 0.00 nm

Data Interval: 1.0000 nm

## Anexo 5

### Espectro UV de la fracción D de flavonoides



#### Description: Fracción D

Spectrum Name: FRAC4.SP

Scan Speed: 120.00 nm/min

Date Created: Fri Nov 21 15:37:31 2014

Slit Width: 1.0000 nm

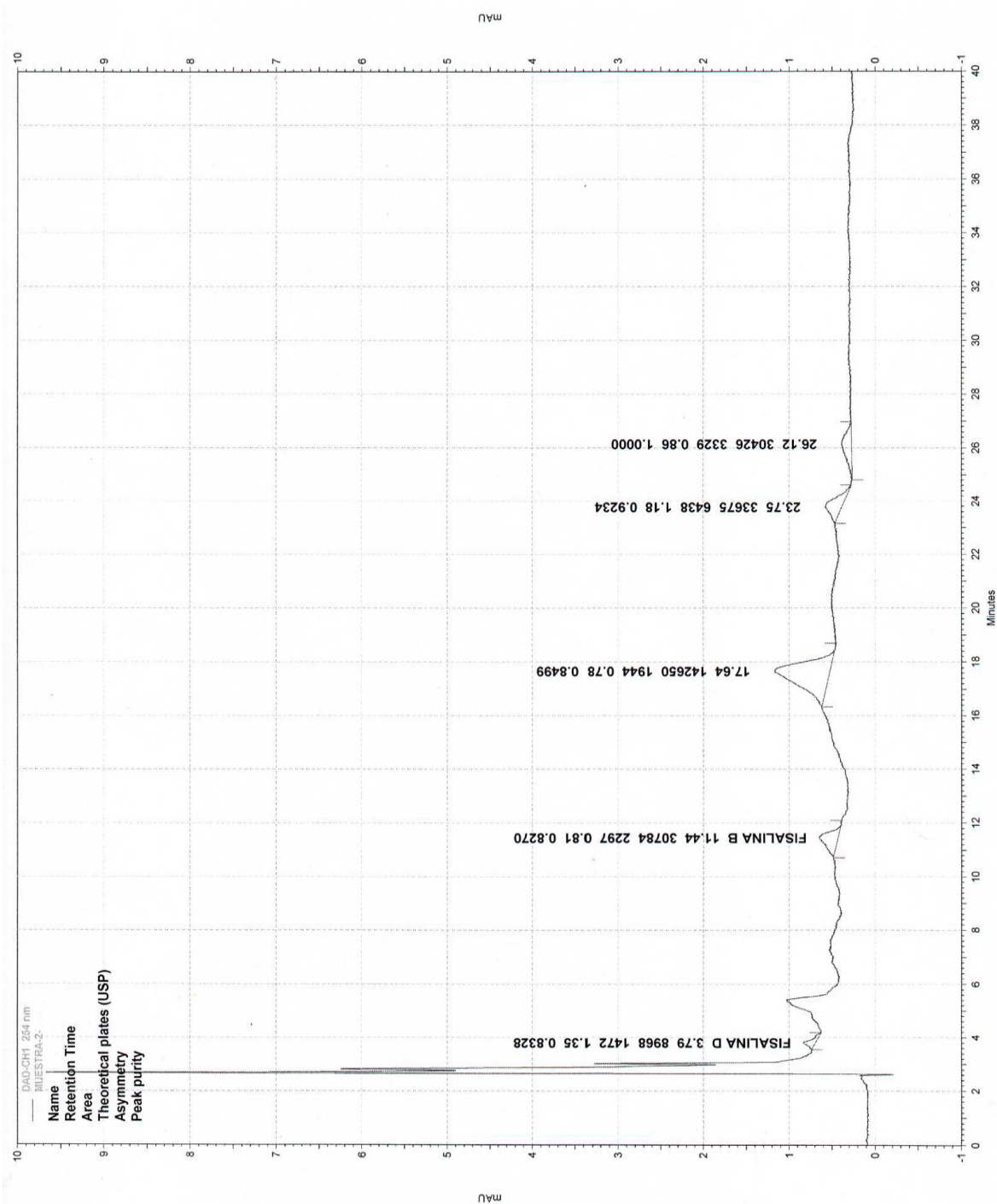
Instrument Model: Lambda 25

Smooth Bandwidth: 0.00 nm

Data Interval: 1.0000 nm

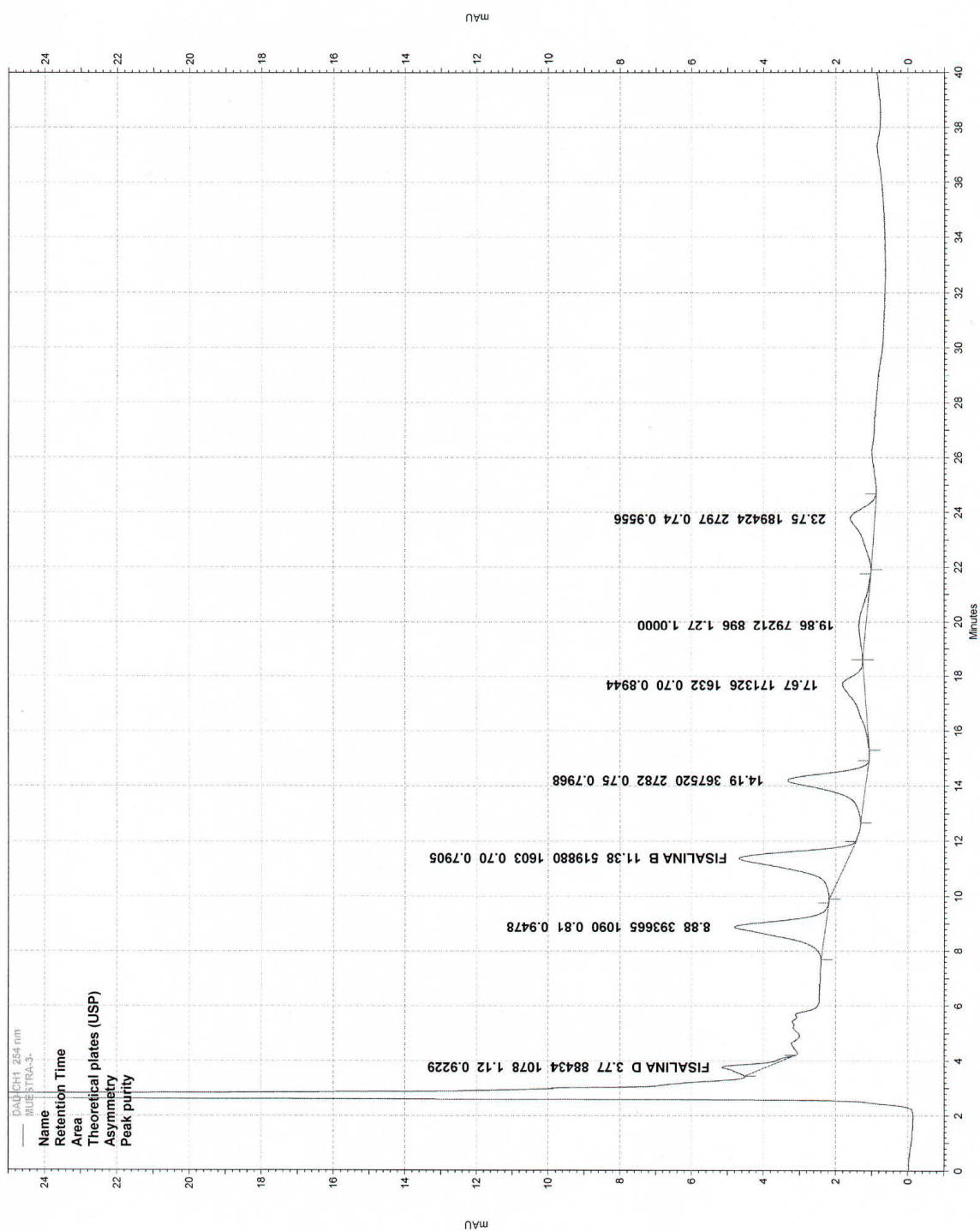
## Anexo 6

### Cromatograma HPLC de la fracción 2 de fisalinas por el método 1



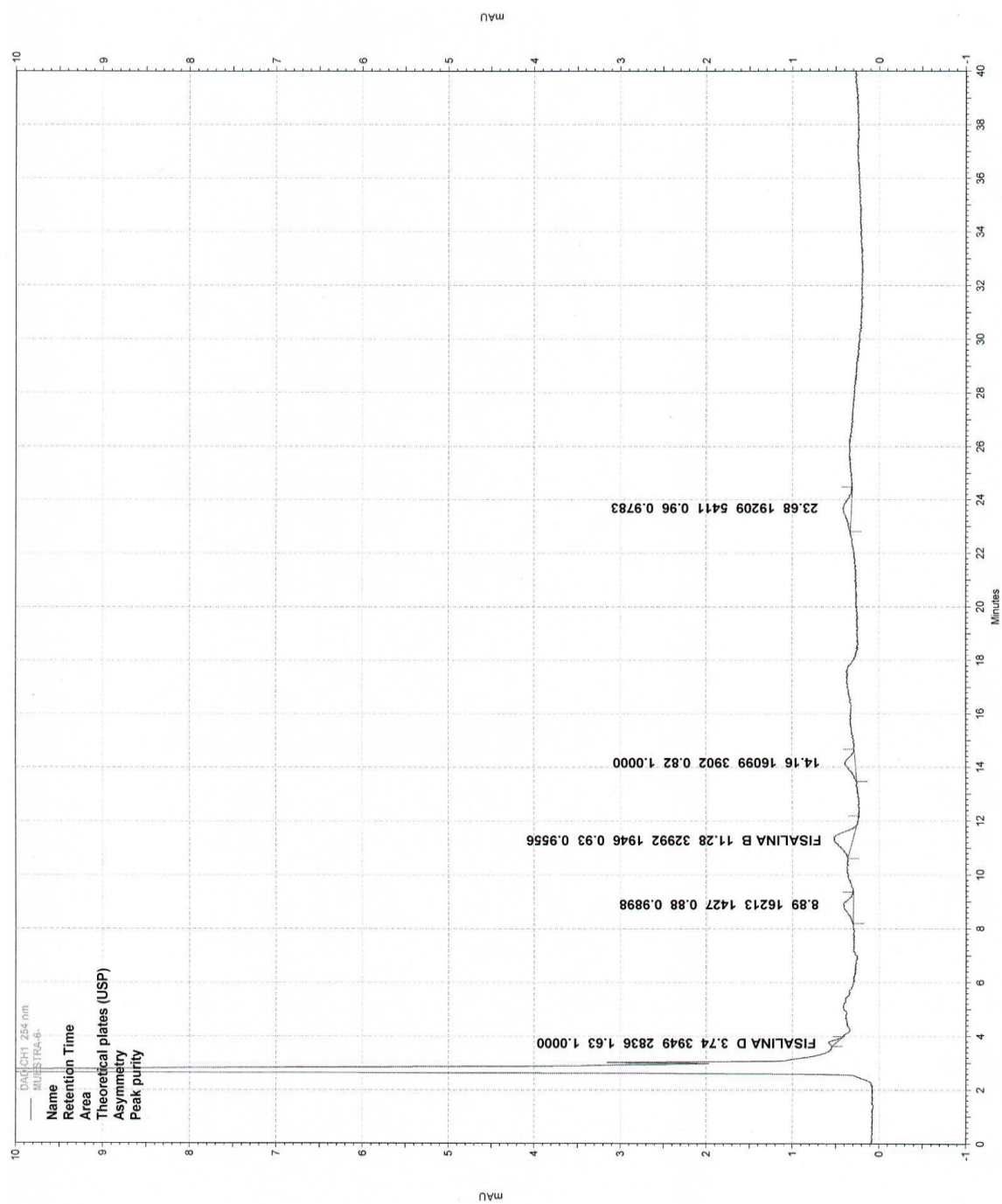
## Anexo 7

### Cromatograma HPLC de la fracción 3 de fisalinas por el método 1



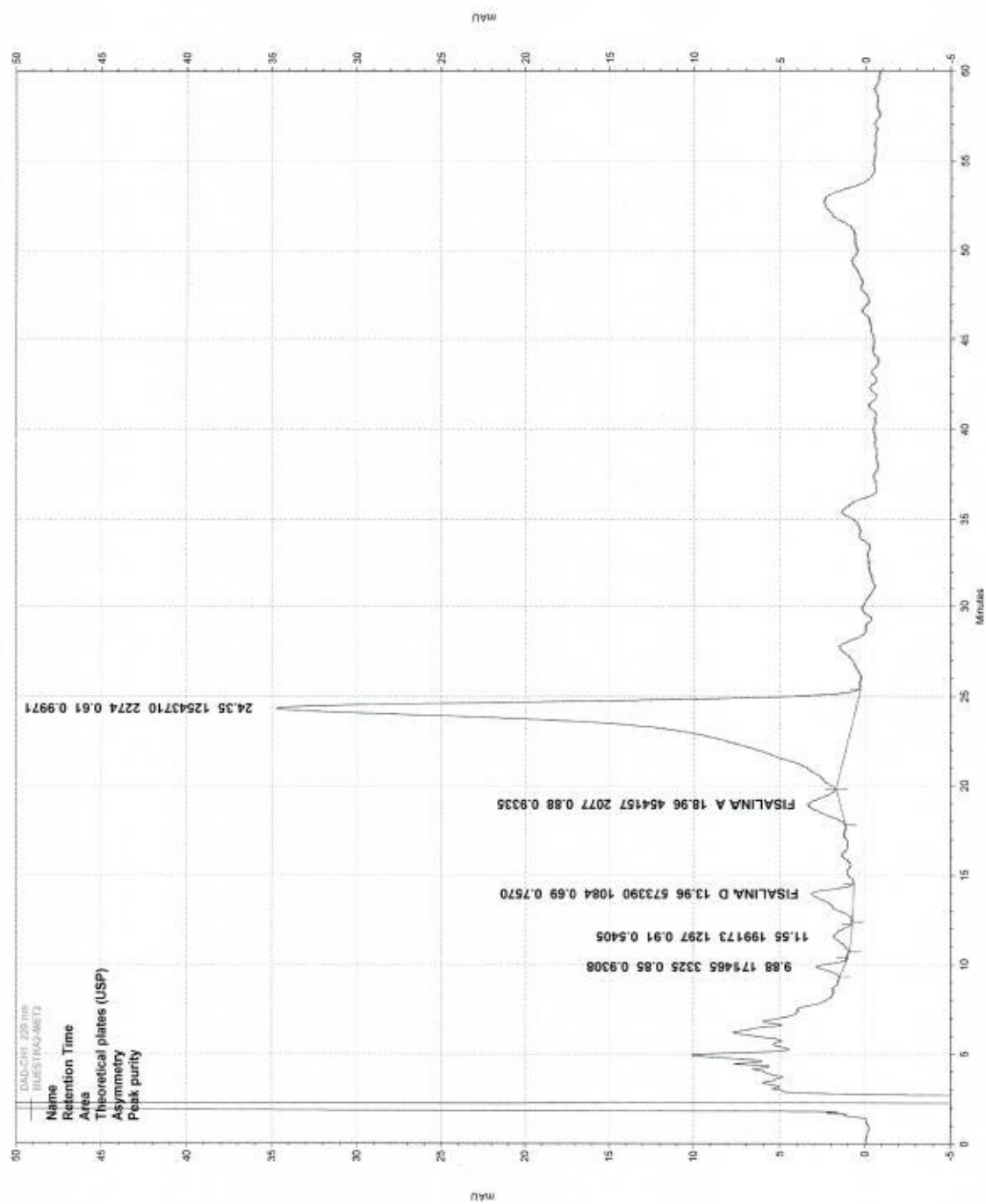
## Anexo 8

### Cromatograma HPLC de la fracción 6 de fisalinas por el método 1



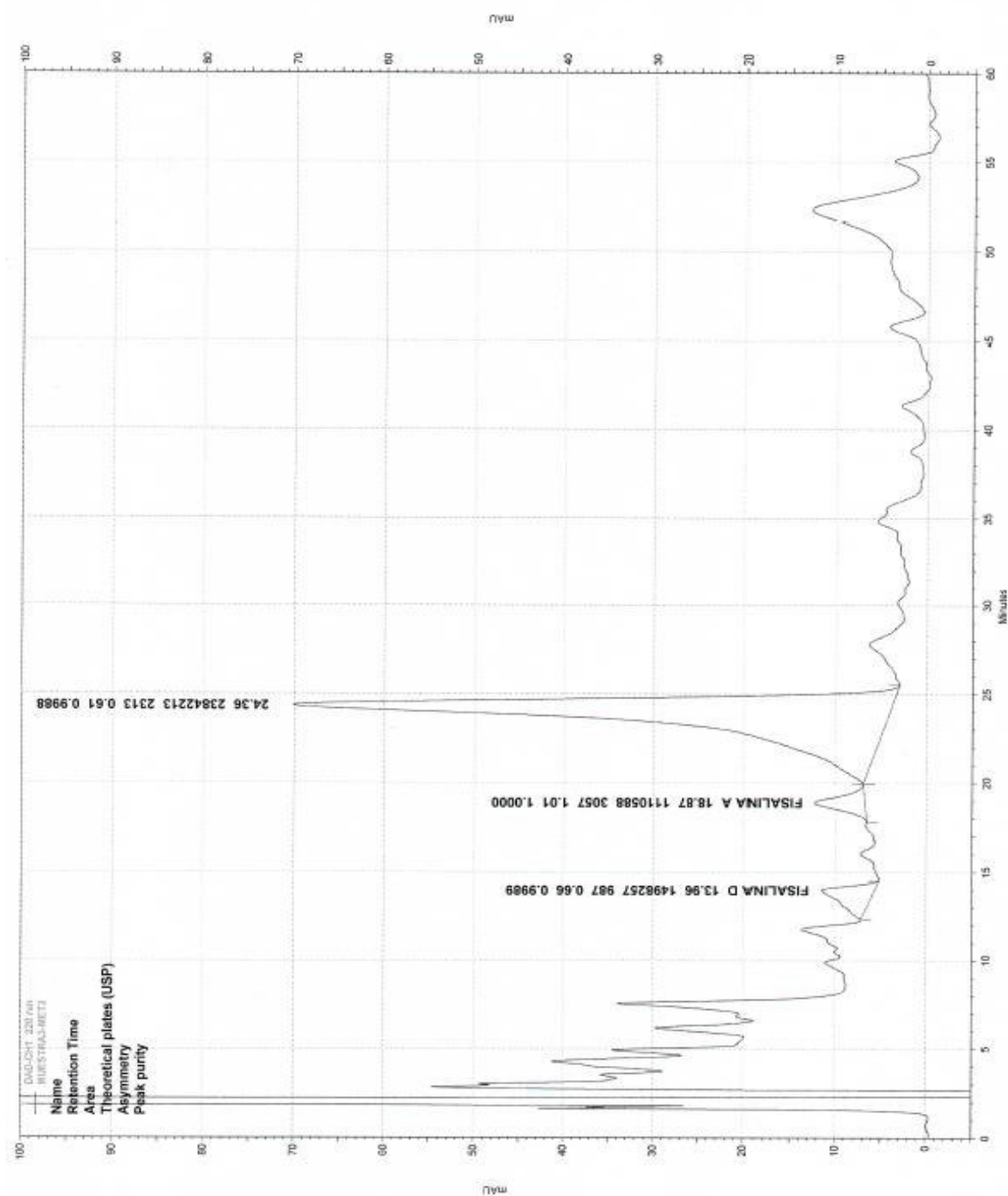
## Anexo 9

### Cromatograma HPLC de la fracción 2 de fisalinas por el método 2



## Anexo 10

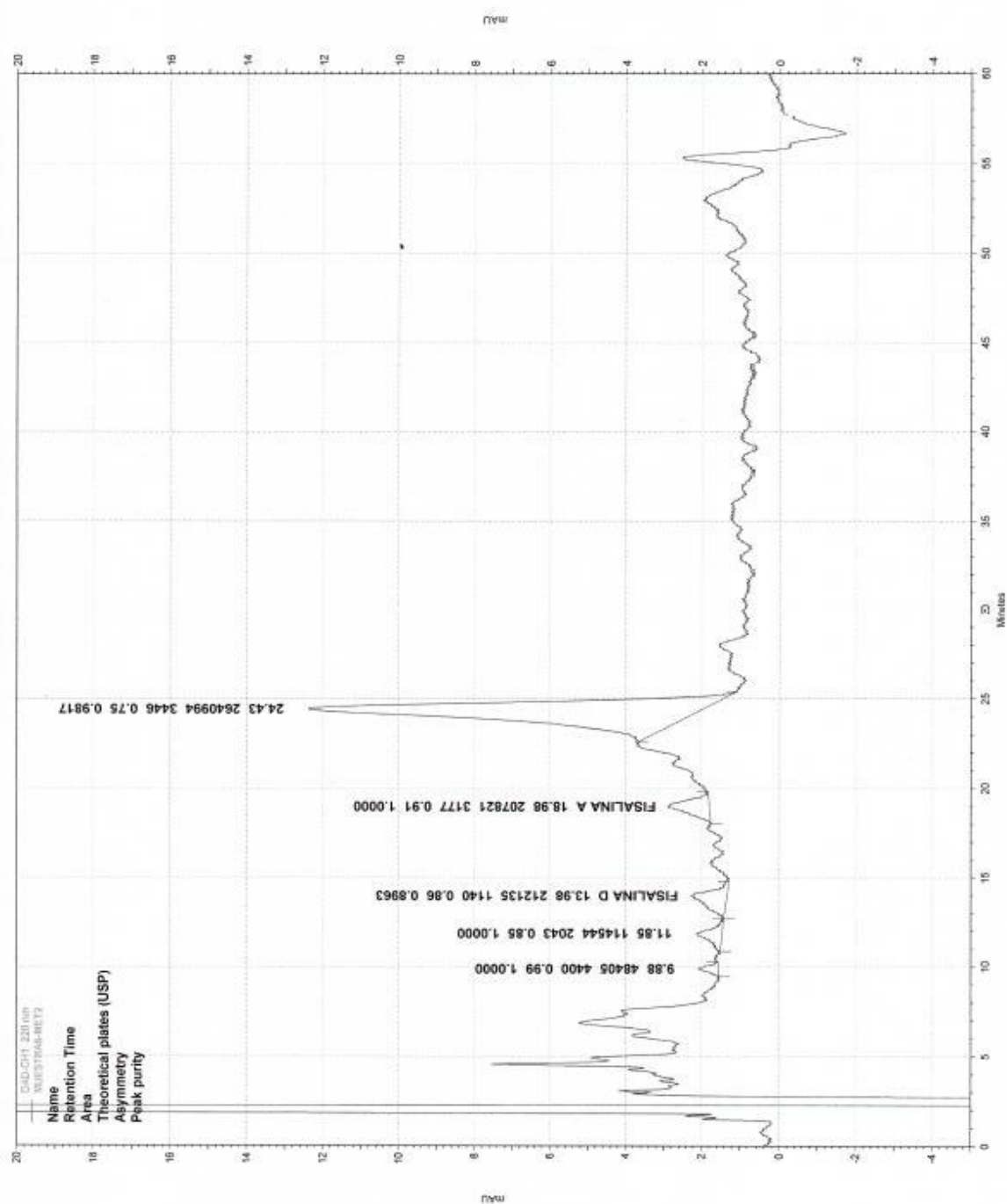
### Cromatograma HPLC de la fracción 3 de fisalinas por el método 2





## Anexo 11

### Cromatograma HPLC de la fracción 6 de fisalinas por el método 2





**Anexo 12.** Densidades ópticas, número de células y porcentaje de crecimiento obtenidos en el ensayo de citotoxicidad en líneas celulares

PLACA No. 0 CONTROL 0 HORAS.		DENSIDADES OPTICAS OBTENIDAS O NUMERO DE CELULAS									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
			3T3	H460	HUTU 80	DU145	MCF7	M14	HT29		K562
A		0.000									
B			0.142	0.103	0.103	0.144	0.130	0.146	0.114		11640
C			0.138	0.109	0.105	0.150	0.127	0.150	0.114		12340
D			0.148	0.109	0.104	0.150	0.133	0.151	0.118		10800
E			0.143	0.098	0.102	0.152	0.129	0.143	0.112		11260
F			0.154	0.099	0.115	0.151	0.130	0.159	0.118		12420
G			0.151	0.103	0.105	0.163	0.134	0.152	0.119		12700
MEDIA			0.146	0.103	0.106	0.151	0.130	0.150	0.116		11860

PLACA 1.1		3T3	DENSIDADES OPTICAS OBTENIDAS.	
			A	B
1			0.500	0.521
2			0.527	0.541
3			0.530	0.553
4			0.542	0.515
5			0.572	0.528
6			0.489	0.523
7			0.018	0.130
8			0.115	0.237
9			0.150	0.383
10			0.251	0.427
11			0.347	0.457
12			0.484	0.518

To	0.14596667	T48=	0.5318	Tcr=	0.38583333	Factor=	259.179266
PLACA No. 1.1		PORCENTAJE DE CRECIMIENTO.					
		A	B				
1			97.1				
2			102.4				
3			105.5				
4			95.6				
5			98.9				
6			97.8				
7		Fracción 2	Fracción 3				
8		-33.2	-4.2				
9		-8.1	23.6				
10		1.0	61.5				
11		27.1	72.8				
12		52.2	80.5				
		87.7	96.4				

GI50=	0.568	2.409					
PLACA 2.1		H460	DENSIDADES OPTICAS OBTENIDAS.				
			A	B			
1			1.108				
2			1.147				
3			1.198				
4			1.047				
5			1.107				
6			1.040				
7			0.091	0.334			
8			0.326	0.741			
9			0.541	1.007			
10			0.734	1.095			
11			0.930	1.157			
12			1.175	1.112			

To	0.10346667	T48=	1.1078	Tcr=	1.00433333	Factor=	99.5685363
PLACA No. 2.1		PORCENTAJE DE CRECIMIENTO.					
		A	B				
7		Fracción 2	Fracción 3				
8		-1.2	23.0				
9		22.2	63.5				
10		43.6	90.0				
11		62.8	98.7				
12		82.3	104.9				
		106.7	100.4				

GI50=	1.532	6.493					
PLACA 3.1		HUTU80	DENSIDADES OPTICAS OBTENIDAS.				
			A	B			
1			0.769				
2			0.882				
3			0.867				
4			0.791				
5			0.900				
6			0.832				
7			0.044	0.090			
8			0.088	0.316			
9			0.210	0.495			
10			0.323	0.672			
11			0.484	0.781			
12			0.672	0.842			

To	0.10553333	T48=	0.8543	Tcr=	0.74876667	Factor=	133.552954
PLACA No. 3.1		PORCENTAJE DE CRECIMIENTO.					
		A	B				
7		Fracción 2	Fracción 3				
8		-8.2	-2.1				
9		-2.3	28.1				
10		13.9	52.0				
11		28.0	75.6				
12		50.6	90.2				
		75.6	98.4				

GI50=	0.536	2.063					
-------	-------	-------	--	--	--	--	--

PLACA 4.1		DU145	DENSIDADES OPTICAS OBTENIDAS.		
			A	B	
	1		0.516		
	2		0.529		
	3		0.507		
	4		0.481		
	5		0.540		
	6		0.474		
<hr/>					
	7		0.129	0.238	
	8		0.223	0.406	
	9		0.316	0.471	
	10		0.404	0.495	
	11		0.482	0.487	
	12		0.457	0.520	
<hr/>					
To=	0.15136667	T48=	0.506	Tcr= 0.35463333	Factor= 281.981389
PLACA No. 4.1	PORCENTAJE DE CRECIMIENTO.				
		A	B		
		Fracción 2	Fracción 3		
	7	-6.2	24.4		
	8	20.1	71.9		
	9	46.5	90.1		
	10	71.3	97.0		
	11	87.6	94.8		
	12	86.3	104.0		
<hr/>					
G150=	1.752	7.193			
PLACA 5.1	MCF-7	DENSIDADES OPTICAS OBTENIDAS.			
		A	B		
	1	0.360			
	2	0.381			
	3	0.365			
	4	0.370			
	5	0.389			
	6	0.390			
<hr/>					
	7	0.114	0.173		
	8	0.165	0.262		
	9	0.215	0.344		
	10	0.221	0.297		
	11	0.267	0.350		
	12	0.335	0.366		
<hr/>					
To	0.130433333	T48=	0.37704	Tcr= 0.24660667	Factor= 405.504042
PLACA No. 5.1	PORCENTAJE DE CRECIMIENTO.				
		A	B		
		Fracción 2	Fracción 3		
	7	-6.7	17.3		
	8	14.2	53.3		
	9	34.3	86.7		
	10	36.9	67.4		
	11	55.3	89.0		
	12	82.7	95.4		
<hr/>					
G150=	0.628	4.437			
PLACA 6.1	M14	DENSIDADES OPTICAS OBTENIDAS.			
		A	B		
	1	0.671			
	2	0.626			
	3	0.675			
	4	0.597			
	5	0.643			
	6	0.625			
<hr/>					
	7	0.083	0.225		
	8	0.219	0.341		
	9	0.293	0.387		
	10	0.340	0.477		
	11	0.364	0.551		
	12	0.440	0.583		
<hr/>					
To	0.149916667	T48=	0.63322	Tcr= 0.48330333	Factor= 206.909394
PLACA No. 6.1	PORCENTAJE DE CRECIMIENTO.				
		A	B		
		Fracción 2	Fracción 3		
	7	-13.9	15.5		
	8	14.3	39.5		
	9	29.6	49.0		
	10	39.3	67.7		
	11	44.3	83.0		
	12	60.1	89.6		
<hr/>					
G150=	0.4546	2.3031			
PLACA 7.1	HT29	DENSIDADES OPTICAS OBTENIDAS.			
		A	B		
	1	0.774			
	2	0.814			
	3	0.813			
	4	0.800			
	5	0.790			
	6	0.745			
<hr/>					
	7	0.115	0.177		
	8	0.185	0.299		
	9	0.263	0.465		
	10	0.313	0.580		
	11	0.453	0.723		
	12	0.586	0.798		
<hr/>					
To	0.115833333	T48=	0.79246	Tcr= 0.67662667	Factor= 147.791988

PLACA No. 7.1		PORCENTAJE DE CRECIMIENTO.							
		A	B						
		Fracción 2	Fracción 3						
7		-0.1	9.0						
8		10.1	27.0						
9		21.8	51.6						
10		29.1	68.6						
11		49.9	89.7						
12		69.4	100.8						
GI50=		0.4794	2.1579						
PLACA 9.1		K562. NUMERO DE CELULAS OBTENIDAS							
		1	2						
1		0	58060						
2		61420	63700						
3		58560	51500						
4		60540	57740						
5		61440	58060						
6		60540	59980						
7		-1080	-1080						
8		9790	16800						
9		12440	25220						
10		14460	38580						
11		24560	52660						
12		38960	60020						
To		11860	T48=						
PLACA No. 9		PORCENTAJE DE CRECIMIENTO.							
		A	B						
		Fracción 2	Fracción 3						
7									
8		-4.3	10.2						
9		1.2	27.7						
10		5.4	55.3						
11		26.3	84.4						
12		56.1	99.7						
GI50=		0.2769	1.1830						
PLACA No. 9.		K562.							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1		54	2957	0	0	2611	1561	0	0
2		3125	3239	0	0	2094	1640	1007	0
3		2982	2629	601	479	2279	1942	1154	728
4		3081	2941	611	766	2513	2434	1524	747
5		3126	2957	824	922	2048	2352	1307	1076
6		3081	3053	1316	2085	2800	3015	1187	2393
7		0	0	82	181	0	0	0	0
8		543	894	1396	2126	544	560	650	787
9		676	1315	2410	2662	814	1102	814	1104
10		777	1983	2854	2810	1036	1160	1093	1354
11		1282	2687	3122	2995	1459	1557	1465	2755
12		2002	3055	0	0	2352	2605	2868	3144
1		0	2903	-54	-54	2557	1507	-54	-54
2		3071	3185	-54	-54	2040	1586	953	-54
3		2928	2575	547	425	2225	1888	1100	674
4		3027	2887	557	712	2459	2380	1470	693
5		3072	2903	770	868	1994	2298	1253	1022
6		3027	2999	1262	2031	2746	2961	1133	2339
7		-54	-54	28	127	-54	-54	-54	-54
8		489	840	1342	2072	490	506	596	733
9		622	1261	2356	2608	760	1048	760	1050
10		723	1929	2800	2756	982	1106	1039	1300
11		1228	2633	3068	2941	1405	1503	1411	2701
12		1948	3001	-54	-54	2298	2551	2814	3090
1		0	58060	-1080	-1080	51140	30140	-1080	-1080
2		61420	63700	-1080	-1080	40800	31720	19060	-1080
3		58560	51500	10940	8500	44500	37760	22000	13480
4		60540	57740	11140	14240	49180	47600	29400	13860
5		61440	58060	15400	17360	39880	45960	25060	20440
6		60540	59980	25240	40620	54920	58220	22660	46780
7		-1080	-1080	560	2540	-1080	-1080	-1080	-1080
8		9780	16800	26840	41440	9800	10120	11920	14660
9		12440	25220	47120	52160	15200	20960	15200	21000
10		14460	38580	56000	55120	19640	22120	20780	26000
11		24560	52660	61360	58820	28100	30060	28220	54020
12		38960	60020	-1080	-1080	45960	51020	56280	61800